

**JAMES D. WATSON**

**Molekular-  
biologie  
des  
Gens**

**ZWEITE AUSGABE**



**Inter European Editions**  
AMSTERDAM





Donat Agosti  
winter 79/80

Lister

# MOLEKULARBIOLOGIE DES GENS

*S. E. Luria gewidmet*

RNA Polymerase  
an einem Promotor?

DNA

Sehen Sie  
die Polymerase?

mRNA Abbau?





**JAMES D. WATSON**

*Harvard University und  
Cold Spring Harbor Laboratory  
Long Island, New York*

# MOLEKULARBIOLOGIE DES GENS

**ZWEITE AUSGABE**

Übersetzt von

**Dr. Anneliese Schimpl**  
*Institut für Virologie der  
Universität Würzburg*



**INTER EUROPEAN EDITIONS  
AMSTERDAM**

Die englische Originalausgabe, herausgegeben von W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, California, U.S.A., erschien unter dem Titel *Molecular Biology of the Gene*, second edition, von James D. Watson.

Copyright © 1970 bei James D. Watson.

*Illustrationen* von Keith Roberts

*Titelbild:* Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polyribosomen an einem *E. coli* Genom

(Von O. L. Miller, Jr., Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Barbara A. Hamkalo und C. A. Thomas, Jr., Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School, freundlicherweise zur Verfügung gestellt)

Copyright © 1975 **Inter European Editions B. V.** für diese Ausgabe.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege sowie der Speicherung und Auswertung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Werden mit schriftlicher Einwilligung des Verlags einzelne Vervielfältigungsstücke für gewerbliche Zwecke hergestellt, ist an den Verlag die nach 54 Abs. 2 UG zu zahlende Vergütung zu entrichten, über deren Höhe der Verlag Auskunft gibt. Inter European Editions B. V., Amsterdam.

Gerdruckt in Spanien.

ISBN 0-201-08534-8



## VORWORT

Die ursprüngliche Version dieses Buches wäre vielleicht nie geschrieben worden, wenn ich gewußt hätte, wieviel Zeit sie letzten Endes kosten würde. Das gleiche gilt für die neue Auflage. Was als Halbtagsbeschäftigung für die Sommermonate begann, dauerte genau ein Jahr, fast genauso lang wie das Schreiben des ursprünglichen Textes. Dieser Zeitraum spiegelt teilweise die ungeheuren Veränderungen wider, die in nur fünf Jahren in der Molekularbiologie vor sich gingen. Ich hatte außerdem fälschlicherweise geglaubt, daß ich die neue Version einfach durch Einfügen neuer Sätze fertigstellen könnte und nicht durch die schwierigere Aufgabe, von Neuem zu beginnen. Später akzeptierte ich aber dann, daß einem schwülstigen Stil nicht die Dauerhaftigkeit des Drucks verliehen werden sollte. Außerdem erkannte ich die Notwendigkeit, neue Daten einzuschließen und Passagen wegzulassen, die nicht mehr stimmten. Mit jedem Monat wurde die revidierte Ausgabe deshalb länger und länger. Trotzdem mußten noch viele Veränderungen in letzter Minute eingefügt werden.

Während all dieser Bemühungen hoffte ich, daß die neue Version, wie die alte, einem großen Leserkreis nützen würde, Studenten des ersten Semesters ebenso wie Biologen in der Praxis, die ein konzises Nachschlagewerk für neue molekularbiologische Daten haben wollen. An vielen Stellen des Textes war ich versucht, ein bestimmtes Faktum einfach wegzulassen, wohl wissend, daß die meisten Studienanfänger es nicht brauchen würden. Andererseits nehme ich an, daß viele dieser Studenten zum ersten Mal in der Grundschule von der Doppelhelix und den Ribosomen gehört haben; wenn sie nun wieder etwas darüber lesen, sollten sie auch die Gelegenheit haben, zu erfahren, wie weit man auf diesem Gebiet bis jetzt gekommen ist. Deshalb wurden mehr scheinbare «Details» eingeschlossen als manchem Leser lieb ist. Mich interessieren sie natürlich, sonst hätte ich das Buch nicht so verlängert, daß es Gefahr läuft, zu lang zu sein.

Wie in der ersten Auflage habe ich es riskiert, einige neue Daten vielleicht als gesicherter darzustellen, als sie es heute sind. Ich kann nur hoffen, daß die meisten dieser Vermutungen sich bewahrheiten werden und daß Lehrer, die dieses Buch als Lehrbuch benützen, nicht allzu viele Fehlinterpretationen korrigieren müssen. Ich weiß, daß ich an manchen Stellen zu sehr vereinfacht habe, aber die Darstellung aller Fakten hätte das Buch für ein allgemeines biologisches Publikum ungeeignet gemacht, da die meisten nicht mit endlosen Komplikationen belästigt werden wollen.

Viele meiner Freunde haben ein oder mehrere Kapitel durchgesehen, mich beraten und mich daran gehindert, eine Reihe von ungenauen Vereinfachungen oder gar Fehler zu machen. Ann Burgess, John Cairns, Lionel Crawford, David Dressler, Bernard Hirt, Raymond Kaempfer, Jeffrey Miller, Carel Mulder, Keith Roberts, Bob Schlieff, Andrew Travers, Rudolf Werner und John Wolfson gaben die praktischsten Kommentare. Ich möchte mich besonders bei Nancy Hopkins für das sorgfältige Durchlesen des gesamten Manuskripts bedanken, wodurch unzählige Verbrechen gegen die englische Sprache und wissenschaftlich schlampige Passagen verhindert wurden. In manchen Fällen war ich jedoch mit einer bestimmten kritischen Anmerkung nicht einverstanden und ich bin daher fraglos für alle verbleibenden Fehler verantwortlich.

Bei der tatsächlichen Vorbereitung des Buches haben mir vor allem die Radcliffe-Studentinnen Lili Gottfried und Helen Trilling einen großen Teil der Belastung abgenommen; das gleiche gilt für die gleichbleibende Freundlichkeit und Kompetenz meiner Sekretärin, DeeDee Skiff. Ich hatte wieder das große Glück, künstlerische Unterstützung von Keith Roberts, St. John's College, Cambridge, England, zu erhalten. Ohne seine unvergleichliche Fähigkeit, die Molekularbiologie klar zu illustrieren, wäre das Buch noch länger geworden.

J. D. WATSON

*Cold Spring Harbor, New York*



# INHALT

## 1 DAS MENDELSCHE WELTBILD

1

Die Zelltheorie	2
Die Zahl der elterlichen Chromosomen bleibt während der Mitose erhalten	4
Bei der Meiose wird die elterliche Chromosomenzahl reduziert	7
Die Zelltheorie ist allgemein anwendbar	8
Die Mendelschen Gesetze	10
Gesetz der unabhängigen Segregation	11
Manche Gene sind weder dominant noch rezessiv	14
Das Prinzip der unabhängigen Kombinationsfähigkeit von Genen	15
Chromosomale Theorie der Vererbung	15
Bestimmung des Geschlechts durch Chromosomen	17
Die Bedeutung von Drosophila	18
Genkopplung und Crossing-over	19
Mehrere Gene kontrollieren die Augenfarbe	24
Ursprung der genetischen Variabilität durch Mutationen	25
Frühe Spekulationen über die Natur der Gene und ihre Wirkungsweise	26
Frühe Versuche, eine Beziehung zwischen Genen und Proteinen zu finden	26
Zusammenfassung	28
Literatur	29

## 2 ZELLEN GEHORCHEN DEN GESETZEN DER CHEMIE

30

Der Begriff des Intermediärstoffwechsels	36
Energieerzeugung durch Oxydations-Reduktions-Vorgänge	36
Die meisten biologischen Oxydationen gehen ohne direkte Beteiligung von Sauerstoff vor sich	37
Der Abbau der Glucose	42
Beteiligung von Phosphor und die Bildung von ATP	43
Die meisten spezifischen Reaktionen in einer Zelle erfordern ein spezifisches Enzym	47
Die Schlüsselposition der Brenztraubensäure: ihre Verwendung im Krebs-Zyklus	50

Oxydation der reduzierten Coenzyme durch die Enzyme der Atmungskette	51
Synthese von ATP in Anwesenheit von Sauerstoff (oxydative Phosphorylierung)	51
Bildung von ATP während der Photosynthese	55
Vitamine und Wachstumsfaktoren	56
Die Labilität großer Moleküle	56
Auswirkungen der Chromatographie	58
Die 25-jährige Einsamkeit der Proteinkristallographen	59
Averys großer Durchbruch: Nukleinsäuren können genetische Information tragen	60
Die Doppelhelix	61
Das Ziel der Molekularbiologie	63
Zusammenfassung	63
Literatur	65

### **3 DIE BAKTERIENZELLE AUS DER PERSPEKTIVE DES CHEMIKERS**

66

Bakterien wachsen unter einfachen, wohldefinierten Bedingungen	66
<i>E. coli</i> ist der Organismus, dessen molekulare Grundlagen am besten bekannt sind	69
Auch kleine Zellen haben eine komplexe Struktur	74
Makromoleküle, die durch lineare Verknüpfung kleiner Moleküle aufgebaut sind	79
Unterscheidung zwischen regelmäßigen und unregelmäßigen Polymeren	87
Stoffwechselwege	87
Abbauwege sind von Biosynthesewegen verschieden	89
Die Bedeutung einer begrenzten Menge von DNA	89
Ein Fünftel bis ein Drittel aller chemischen Reaktionen, die in <i>E. coli</i> ablaufen, sind bekannt	92
Zusammenfassung	93
Literatur	94

### **4 DIE BEDEUTUNG SCHWACHER CHEMISCHER WECHSELWIRKUNGEN**

95

Definition und einige Eigenschaften chemischer Bindungen	96
Chemische Bindungen können mit Hilfe der Quantenmechanik erklärt werden	97
Die Knüpfung einer chemischen Bindung geht mit einer Änderung der Energieform einher	97
Gleichgewicht zwischen Bindungsbildung und Bindungsspaltung	99
Der Begriff der freien Energie	100
Zwischen $K_{\text{äqu}}$ und $\Delta G$ besteht ein logarithmischer Zusammenhang	101
Kovalente Bindungen sind sehr starke Bindungen	101
Energiewerte sekundärer Bindungen liegen zwischen 1 und 7 kcal/Mol	102
Bei physiologischen Temperaturen werden schwache Wechselwirkungen ständig gespalten und neu gebildet	102
Enzyme sind an der Bildung (Spaltung) schwacher Wechselwirkungen nicht beteiligt	102



Unterscheidung zwischen polaren und nichtpolaren Molekülen	103
Van der Waals-Kräfte	104
Wasserstoff-Brückenbindungen	108
Manche ionischen Bindungen sind eigentlich Wasserstoff-Brückenbindungen	110
Schwache Wechselwirkungen erfordern komplementäre Moleküloberflächen	111
H <sub>2</sub> O-Moleküle bilden Wasserstoffbrücken	111
Schwache Wechselwirkungen zwischen Molekülen in wäßriger Lösung	113
Organische Moleküle, die Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen, sind wasserlöslich	113
Die Einmaligkeit der Molekülgestalt; der Begriff einer selektiven «Klebrigkeit»	114
Der Vorteil von $\Delta G$ -Werten zwischen 2 und 5 kcal/Mol	117
Enzym-Substrat-Komplexe werden durch schwache Wechselwirkungen zusammengehalten	117
Die Molekülgestalt wird meistens durch schwache Wechselwirkungen bestimmt	118
Polymere haben manchmal Helixstruktur	119
Proteinstrukturen sind im allgemeinen unregelmäßig	121
DNA kann eine regelmäßige Helix bilden	122
DNA-Moleküle sind bei physiologischen Temperaturen stabil	122
Die meisten Proteinmoleküle mittlerer Größe und fast alle großen Proteinmoleküle sind Aggregate kleinerer Polypeptidketten	125
Untereinheiten sparen der Zelle Arbeit	126
Das Prinzip der spontanen Aggregation	127
Zusammenfassung	128
Literatur	130

## 5 GEKOPPELTE REAKTIONEN UND GRUPPENÜBERTRAGUNGEN

131

Nährstoffmoleküle sind thermodynamisch instabil	132
Unterscheidung zwischen Richtung und Geschwindigkeit einer Reaktion	133
Enzyme setzen die Aktivierungsenergie herab	134
Stoffwechselvorgänge sind durch Abnahme der freien Energie gekennzeichnet	135
Bei der Hydrolyse energiereicher Bindungen ist $\Delta G$ stark negativ	136
Energereiche Bindungen sind für Biosyntheseschritte notwendig	138
Peptidbindungen hydrolysieren spontan	139
Kopplung von negativen und positiven $\Delta G$ -Werten	139
Aktivierung durch Gruppenübertragung	140
Die vielfältige Verwendbarkeit des ATP bei Gruppenübertragungen	141
Aktivierung von Aminosäuren durch Bindung von AMP	143
Nukleinsäurevorstufen werden durch $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ -Gruppen aktiviert	143
Bedeutung der $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ Freisetzung für die Nukleinsäuresynthese	144
Spaltungen von $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ -Bindungen sind für die meisten biosynthetischen Reaktionen charakteristisch	145
Zusammenfassung	146
Literatur	147

**6 DER BEGRIFF DER MATRIZEN-OBERFLÄCHE****148**

- Synthese kleiner Moleküle 149
- Synthese großer «kleiner Moleküle» 152
- Synthese eines regelmäßigen, sehr großen polymeren Moleküls 154
- Eine genauere Betrachtung der Proteinstruktur 157
- Die Primärstruktur von Proteinen 159
- Sekundärstrukturen von Proteinen können Faltblattstrukturen oder Helices sein 162
- Tertiärstrukturen von Proteinen sind äußerst unregelmäßig 163
- S-S-Brücken bilden sich spontan zwischen den richtigen Partnern 164
- Enzyme sind nicht in der Lage, die Aminosäuresequenz in Proteinen zu bestimmen 164
- Matrizen Wechselwirkungen beruhen auf schwachen Wechselwirkungen 166
- Anziehung zwischen Gegensätzlichem oder Annäherung von Gleichem 166
- Ein chemisches Argument gegen die Existenz von Proteinmatrizen 168
- Zusammenfassung 169
- Literatur 170

**7 DIE ANORDNUNG DER GENE AUF DEN CHROMOSOMEN****171**

- Wir müssen noch viel über die molekularen Grundlagen der Chromosomenstruktur lernen 172
- Genetische Kreuzungen 173
- Kartierung von Chromosomen 174
- Bedeutung der Untersuchungen von Mikroorganismen 180
- Die Bedeutung von Mutagenen 180
- Mutationen bei Bakterien: Verwendung von Wachstumsfaktoren 181
- Auch Viren enthalten Chromosomen 183
- Viren vermehren sich nicht durch allmähliches Größenwachstum 185
- Viren sind genetische Parasiten 187
- Bakterienviren (Phagen) sind oft leicht zu untersuchen 187
- Phagen bilden Plaques 189
- Viruschromosomen werden manchmal in die Chromosomen der Wirtszelle eingebaut 189
- Kartierung von Bakterienchromosomen durch Paarung 192
- Bakterienchromosomen sind ringförmig 195
- Phagen tragen manchmal bakterielle Gene 201
- Übertragung gereinigter Chromosomenfragmente 202
- Auch Phagen können mutieren 204
- Phagenkreuzungen 206
- Vielfache Paarungen bei Virus-Kreuzungen 208
- Zusammenfassung 210
- Literatur 212

**8 STRUKTUR UND FUNKTION DER GENE****213**

- Rekombination innerhalb der Gene ermöglicht Genkartierung 214
- Der Komplementationstest zeigt, ob zwei Mutationen im gleichen Gen liegen 216
- Genetische Kontrolle der Proteinfunktion 220



Eine Gen - eine Polypeptidkette	223
Rezessive Gene bilden häufig keine funktionsfähigen Produkte	223
Gene mit verwandten Funktionen sind oft benachbart	224
Beweis, daß Gene die Aminosäuresequenzen in den Proteinen bestimmen	226
Das Gen ist mit seinem Polypeptidprodukt kolinear	228
Eine mutierbare Stelle kann in mehreren verschiedenen Formen vorliegen	229
Einzelne Aminosäuren werden durch mehrere benachbarte mutierbare Stellen bestimmt	229
Eine ganz bestimmte, einmalige Aminosäuresequenz ist für enzymatische Aktivität nicht erforderlich	232
Scheinbare Rückmutationen bewirken gelegentlich einen zweiten Aminosäureaustausch	234
Zusammenfassung	235
Literatur	236

## DIE REPLIKATION DER DNA

237

Das Gen besteht (fast immer) aus DNA	239
Die Menge der DNA in Chromosomen ist konstant	239
Virale Gene bestehen auch aus Nukleinsäuren	241
DNA ist normalerweise eine Doppelhelix	242
Die komplementäre Gestalt weist sofort auf Selbstreplikation hin	247
Die Basenpaarung sollte eine sehr genaue Replikation erlauben	248
Die DNA enthält die gesamte Spezifität, die für ihre Selbstreplikation erforderlich ist	250
Sichere Beweise für die Trennung von DNA-Strängen	252
Einsträngige DNA wird ebenfalls durch Basenpaarung repliziert	253
Einzelne DNA-Moleküle sind die Chromosomen von Viren und <i>E. coli</i>	256
DNA-Moleküle haben manchmal ringförmige Gestalt	258
Replikation eines biologisch aktiven DNA-Moleküls im Reagenzglas	259
Die Replikation muss mit einem Endonukleaseschnitt beginnen	262
Hinweise auf spezifische Anfangspunkte	262
Direkte Darstellung sich replizierender DNA	263
Das Kettenwachstum geht sowohl in der 5' nach 3' als auch in der 3' nach 5' Richtung vor sich	263
Die Bedeutung der kleinen Fragmente, die nahe den Wachstumspunkten zu finden sind	265
Bindung des Tochterpolynukleotidmaterials an Elternstränge	266
Das «Rolling Circle» - Modell	268
Modell zweier Rolling Circles, die sich in entgegengesetzter Richtung drehen	268
Einzelne Rolling Circles	271
Reparatursynthese	272
Zellen ohne DNA-Polymerase	275
Die Rolle der Membran bei der Replikation	275
Zusammenfassung	276
Literatur	276

## 10 DIE GENETISCHE ORGANISATION DER DNA 279

- Theoretisch kann es eine überaus große Anzahl von verschiedenen Sequenzen geben 279
- Mutationen sind Veränderungen in der Sequenz der Basenpaare 280
- Genaue Angaben über einige chemische Mutagene 283
- Die Abstände zwischen den Genen sind verhältnismäßig kurz 286
- Übereinstimmung der Genkarte mit dem entsprechenden Abstand auf einem DNA-Molekül 286
- Ein durchschnittliches Gen enthält ungefähr 900 bis 1500 Nukleotidpaare 288
- Crossing-over beruht auf Spaltung und Wiedervereinigung von intakten DNA-Molekülen 291
- Die Rolle spezifischer Enzyme bei der Rekombination 295
- Stabilisierung gestreckter einsträngiger Enden durch ein die Rekombination förderndes Protein 296
- Heteroduplices 298
- Die Rekombination am Ort des Crossing-over ist nicht immer reziprok 299
- Insertionen (Deletionen), die durch Irrtümer beim Crossing-over entstehen 301
- Hot spots sind oft Stellen falscher Paarung 302
- Der genetische Code wird in Dreiergruppen gelesen 304
- Zusammenfassung 307
- Literatur 307

## 11 DIE TRANSKRIPTION VON RNA AN DNA-MATRIZEN 309

- Das zentrale Dogma 309
- Proteinsynthese in Abwesenheit von DNA 310
- RNA ist chemisch der DNA sehr ähnlich 314
- RNA ist für gewöhnlich einzelsträngig 314
- Die enzymatische Synthese von RNA an DNA-Matrizen 314
- In jedem Gen fungiert nur ein DNA-Strang als Matrice für RNA 320
- RNA-Ketten sind nicht zirkulär 323
- Die Synthese der RNA-Ketten läuft in einer festgelegten Richtung ab 323
- Aufbau der RNA-Polymerase aus Untereinheiten 327
- Erkennung von Startsignalen durch  $\sigma$  327
- Ketten beginnen entweder mit pppA oder pppG 328
- Freisetzungsfaktoren liefern Ketten von begrenzter Länge 328
- Zusammenfassung 330
- Literatur 331

## 12 DIE ROLLE DER RNA BEI DER PROTEINSYNTHESE 332

- Aminosäuren haben keine spezifische Affinität für RNA 332
- Aminosäuren binden sich mit Hilfe von Adaptoren an RNA-Matrizen 333
- Spezifische Enzyme erkennen spezifische Aminosäuren 333
- Die Adaptormoleküle sind selbst RNA-Moleküle 335



Hefe Alanin-tRNA enthält 77 Nukleotide	338
Kleeblattfaltung der tRNA-Moleküle	339
Kristalline tRNA	340
Die Bindung des Adaptors aktiviert auch die Aminosäure	340
Die Bildung von Peptidbindungen findet an Ribosomen statt	342
Die Rekonstitution von Ribosomen	342
Mit Ribosomen verbundene RNA enthält für gewöhnlich keine genetische Information	346
Matrizen RNA (mRNA) verbindet sich reversibel mit Ribosomen	347
rRNA kommt in zwei besonders wichtigen Größenklassen vor	347
Die Funktion der rRNA ist noch nicht bekannt	348
Alle drei Arten von RNA werden auf DNA-Matrizen hergestellt	348
mRNA-Moleküle sind in vielen verschiedenen Größen vorhanden	349
Ribosomen trennen sich während der Proteinsynthese in ihre Untereinheiten auf	350
Das Wachstum der Polypeptidketten beginnt am aminoterminalen Ende	351
Alle bakteriellen Polypeptidketten beginnen mit N-Formyl-Methionin	352
Bindung der kleineren ribosomalen Untereinheiten an spezifische Stellen auf mRNA-Molekülen	356
Initiierungsfaktoren	357
Die Leserichtung der mRNA ist von 5' nach 3'	357
Jedes Ribosom hat zwei tRNA Bindungsstellen	359
Die Existenz von Transferfaktoren	361
Bindung der AS~tRNA an die «A»-Bindungsstelle erfordert den Transferfaktor I	361
Das Enzym, das die Peptidbindung bildet, ist ein integraler Bestandteil der 50S-Partikel	361
Translokation der Peptidyl-tRNA erfordert den Transferfaktor II	362
Inhibition spezifischer Schritte bei der Proteinsynthese durch Antibiotika	362
Polypeptidketten falten sich schon während der Synthese	364
Die Kettenfreisetzung hängt von spezifischen Freisetzungsfaktoren ab, die Kettenabschließende Codons benötigen	364
Spaltung in Polypeptidketten nach Kettenabschluß	365
Ein mRNA-Molekül arbeitet gleichzeitig an mehreren Ribosomen	365
Über die Ribosomen bleibt noch sehr viel zu lernen	366
Zusammenfassung	369
Literatur	371

## 13 DER GENETISCHE CODE

372

Die Beigabe von mRNA stimuliert die <i>in vitro</i> Proteinsynthese	372
Virus RNA ist mRNA	373
Spezifische Proteine können in zellfreien Systemen synthetisiert werden	374
Stimulation von Aminosäureinkorporation durch synthetische mRNA	376
Poly U codiert Polyphenylalanin	378
Gemischte Kopolymere erlauben zusätzliche Codonzuordnungen	378
Bestimmung der Anordnung von Codons durch tRNA-Bindung	379
Codonzuordnung durch regelmäßige Kopolymere	480

Der Code ist entartet	383
Der «Wobble» im Anticodon	384
Seltene tRNA-Spezies	387
AUG und GUG als Initiierungs-Codons	387
Codons für den Kettenabschluß	388
Beendigung einer Botschaft für ein Polypeptid durch zwei aufeinanderfolgende Stoppcodons	388
«Nonsense»- gegenüber «Missense»-Mutationen	389
Nonsense-Mutationen führen zu unvollständigen Polypeptidketten	392
Bei zellfreier Proteinsynthese können Lesefehler auftreten	392
Suppressorgene stören die Ablesung des genetischen Codes	393
Spezifische Codons werden durch spezifische Suppressorgene falsch gelesen	395
An der Nonsense Suppression sind mutierte tRNAs beteiligt	396
tRNA-vermittelte Missense-Suppression	398
Mutationen in Ribosomen beeinträchtigen ebenfalls die Ablesegenauigkeit	398
Streptomycin verursacht Ablesefehler	399
Suppressorgene lesen auch intakte Gene falsch	399
Der Code ist für die meisten, wenn nicht sogar alle Spezies identisch	403
Zusammenfassung	403
Literatur	404

## 14 REGULATION DER SYNTHESE UND FUNKTION VON PROTEINEN

406

Nicht alle Proteine werden in der gleichen Menge synthetisiert	406
Unterschiede in den Mengen verschiedener <i>E. coli</i> -Proteine	407
Beziehung zwischen Menge eines bestimmten Proteins und Bedarf	408
Schwankungen in der Proteinmenge können die Anzahl spezifischer mRNA-Moleküle widerspiegeln	409
Repressoren kontrollieren die Syntheserate vieler mRNA Spezies	410
Repressoren sind Proteine	411
Repressoren wirken dadurch, daß sie sich an die DNA binden	412
Korepressoren und Induktoren bestimmen den funktionellen Zustand der Repressoren	412
Repressoren können mehr als ein Protein kontrollieren	414
Das Fehlen eines Operatorgens führt zu konstitutiver Synthese	416
mRNA-Synthese beginnt in der Nähe des Promotors	416
Ungleiche Produktion von Proteinen, die durch ein einziges mRNA-Molekül codiert werden	421
Bakterielle mRNA ist häufig metabolisch instabil	422
Proteine, die nicht unter direkter Kontrolle durch die Umgebung stehen	424
Die Synthese von Repressoren steht im allgemeinen unter der Kontrolle des Promotors, nicht unter der des Operators	425
Die Frage der positiven Kontrolle	426
Spezifische $\sigma$ -Faktoren können größere Gruppen von nicht miteinander in Beziehung stehenden Genen anschalten	428



Die Existenz eines Glucose-sensitiven Operons	428
Der Glucosekatabolismus beeinflusst die Menge von zyklischem AMP	429
Regulation der Proteinfunktion durch Rückkopplungshemmung	429
Zusammenfassung	434
Literatur	435

## 15 DIE REPLIKATION VON VIREN

437

Core und Hülle von Viren	437
Nukleinsäuren: die genetische Komponente aller Viren	441
Virusnukleinsäure kann entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein	442
Virusnukleinsäure- und Proteinsynthese laufen unabhängig voneinander ab	442
Virusnukleinsäuren codieren sowohl Enzyme wie auch Hüllproteine	443
Vorgänge bei der Morphogenese	445
Virusinfektion führt häufig zu drastischen Änderungen im Stoffwechsel der Wirtszelle	449
Synthese Virus-spezifischer Proteine	449
Die Unterscheidung zwischen Früh- und Spätproteinen	450
Kontrolle des Zeitpunkts der Genfunktion durch Anordnung der Gene	451
Die Suche nach den fehlenden T4 Repressoren	452
$\sigma$ -Faktoren, die spezifisch für späte mRNA sind	453
Der $\lambda$ -Repressor hält den Prophagenzustand aufrecht	454
Positive Kontrolle ausgeübt durch den Antiterminationsfaktor des «N» Gens	455
Ein einziger Promotor für alle späten $\lambda$ -Gene	456
Kleine DNA-Phagen bestehen aus einem einzigen Operon	459
Selbstreplikation der Virus-RNA: Bedarf für ein neues Virus-spezifisches Enzym	459
RNA-Phagen sind äußerst einfach	461
Anfängliche Bindung von Ribosomen an zwei unabhängigen Stellen	462
Polaritätsgradienten	464
Die drei R17-Proteine werden nicht in gleichen Mengen produziert	464
Synthese biologisch aktiver Q $\beta$ -RNA im Reagenzglas	465
Aussicht auf baldige Aufklärung der kompletten Nukleotidsequenz von Q $\beta$ und R17	466
Satelliten RNA codiert nur Hüllproteinmoleküle	469
Noch kleinere als die schon bekannten kleinsten Viren sind kaum möglich	469
Es gibt eine untere Grenze für die Größe sich teilender Zellen	470
Zusammenfassung	471
Literatur	472

## 16 MOLEKULARBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER EMBRYOLOGIE

474

Die Menge von DNA pro Zelle steigt von <i>E. coli</i> zu Säugetieren ca. um das achthundertfache	475
Konzentration auf Organismen mit leicht zu beobachtender Spaltungsteilung	476
Das Kernproblem der Embryologie ist die Zelldifferenzierung	477

Die Differenzierung ist häufig irreversibel	479
Die Differenzierung ist im allgemeinen nicht auf Gewinn oder Verlust eines Chromosoms zurückzuführen	480
Multizelluläre Organismen müssen kontrollieren können, zu welchem Zeitpunkt Gene aktiv sind	480
Es ist notwendig, einfache Modellsysteme zum Studium der Differenzierung zu finden	481
Sporulation von Bakterien ist das einfachste aller Modellsysteme	482
Unterschied zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen	485
Es gibt heute viele Gründe, Organismen wie Hefe intensiver zu untersuchen	486
Mitochondrien als defekte prokaryotische Symbionten	487
Reversible Stadien der Schleimpilzzellen	488
Wachstum höherer tierischer Zellen in Gewebekultur	483
Klonierung hochdifferenzierter Zellen	492
Unterteilung des Zellzyklus in M, G <sub>1</sub> , S und G <sub>2</sub> -Phasen	492
Die Transkription als biologischer Zeitmesser	494
Das Eukaryotenchromosom	496
DNA-Replikation beginnt an mehreren verschiedenen Stellen auf einem bestimmten Chromosom	499
Aktive (Euchromatin) gegenüber inaktiven (Heterochromatin) Regionen auf Chromosomen	499
Sogar die kleinsten Banden (Schlingen) müssen sehr, sehr viele Gene enthalten	503
Vielfach repetierte DNA-Sequenzen	504
Unterschiede im DNA-Gehalt nahe verwandter Spezies	506
Die rRNA-Synthese findet in Bereich des Nukleolus statt	507
Ein Großteil der neu synthetisierten RNA in höheren Zellen liegt vorerst als Teil sehr großer Moleküle vor	509
Ein Großteil der RNA verläßt niemals den Kern	510
Die Lebensdauer von Polyribosomen in Zellen, die sich rasch teilen	511
In sich nicht teilenden, differenzierten Zellen gibt es stabile mRNA-Moleküle	511
Selektive Vermehrung von rRNA-Genen in Oozyten	512
Differenzierte somatische Zellen mit extrachromosomalen Genen	513
Die Differenzierung ist auf der Ebene des Kerns im allgemeinen nicht irreversibel	514
Eine irreversible zytoplasmatische Differenzierung geht mit dem Verlust der Teilungsfähigkeit einher	514
Reaktivierung ruhender Kerne durch Fusion mit aktiven Zellen	516
Positive Kontrolle der Genfunktion	518
Präformierte mRNA auf dem Weg zur Gastrulation	518
Weitere Aufklärung des Eukaryotenchromosoms	520
Zusammenfassung	520
Literatur	522

## 17 DAS PROBLEM DER ANTIKÖRPERSYNTHESE

524

Antigene sind Substanzen, die die Antikörpersynthese stimulieren	524
Antikörper sind immer Proteine	527



Aufbau des $\gamma$ G-Antikörpermoleküls aus zwei leichten und zwei schweren Ketten	527
Die Spezifität der Antikörper beruht auf der Aminosäuresequenz	529
Myelomproteine als Modelle für individuelle Antikörper	531
Bence-Jones Proteine sind spezifische leichte Ketten	532
Leichte und schwere Ketten bestehen aus konstanten und variablen Bereichen	532
Ursprung der schweren Kette durch wiederholte Duplikation eines primitiven Antikörpergens	533
Sowohl leichte als auch schwere Ketten beeinflussen die Spezifität von Antikörpern	537
Plasmazellen sind der Ort der Antikörpersynthese	537
Eine gegebene Plasmazelle synthetisiert gewöhnlich nur Antikörpermoleküle eines Typs	539
Die zweite Injektion von Antigen führt zu einer gesteigerten Zahl Antikörper-produzierender Zellen	539
Antikörper-produzierende Zellen brauchen kein Antigen zu enthalten	541
Klon-Selektionstheorie	541
Immunologische Toleranz	543
Induktion von Antikörpern <i>in vitro</i>	544
Zusammenfassung	545
Literatur	546

## 18 DER KREBS AUS DER PERSPEKTIVE DES GENETIKERS 548

Krebs kann in fast allen differenzierten Zellen entstehen	550
Krebszellen wachsen, wenn sie nicht sollten	550
Kontaktinhibition	551
Malignität als Verlust der zellulären Affinitäten	552
Suche nach chemischen Unterschieden zwischen normalen und Krebszellen	553
Warburg und die Bedeutung erhöhter Glykolyse	554
Tumor-spezifische Antigene	554
Selektive Präzipitation von Krebszellen durch ein pflanzliches Glykoprotein	555
Krebserregung durch Strahlung und Chemikalien	556
Krebs als erbliche Veränderung	556
Somatische Mutationen als mögliche Krebsursachen	557
Viren als Krebsursache	558
Die sehr einfache Struktur einer Polyoma (SV40)-Partikel	559
Lytische Infektion gegenüber Transformation	561
Permissive gegenüber nichtpermissiven Zellen	562
Frühe und späte Polyoma Messengers	564
Die Polyomagenetik steckt noch in den Kinderschuhen	565
Induktion von Wirtsenzymen, die an der DNA-Synthese beteiligt sind	565
Abortive Infektionen gehen der Transformation voraus	566
Eine Partikel kann eine Zelle transformieren	567
Abwesenheit infektiöser Polyomapartikeln in transformierten Zellen	567
Die Transformation erfordert die Integration von Polyoma (SV40)-DNA in Wirtschromosomen	567

Freisetzung infektiöser Partikeln nach der Fusion einer transformierten nichtpermissiven Zelle mit einer nichttransformierten permissiven Zelle	568
Virus-spezifische mRNA in transformierten Zellen	569
Enthalten permissive Zellen $\sigma$ -Faktoren, die gebraucht werden, um späte Gene zu lesen?	570
Virus-infizierte Zellen neigen dazu, Nukleinsäure zu synthetisieren	571
Virus-induzierte Veränderungen an der Zelloberfläche	572
Das Rous-Sarkom wird durch ein myxoähnliches Virus verursacht	573
Myxoviren reifen auf Zelloberflächen	574
Genome von RNA-Tumoviren sind relativ groß und codieren ungefähr 30-50 verschiedene Proteine	575
Infektion durch eine einzige RSV-Partikel führt zu einer Krebszelle	576
RSV-transformierte Zellen produzieren oft andere Rous-ähnliche Viren	576
Helferviren können selbst ebenfalls Krebs verursachen	577
DNA als die Provirus-Form von RNA-Tumoviren	578
Das Burkitt-Lymphom und seine Beziehung zur Mononukleose	579
Herpes II-Viren und Cervixkarzinom	580
Die Suche nach RNA-Tumoviren beim Menschen	580
Theorie des RNA-Onkogens	581
DNA-Tumoviren wirken höchstwahrscheinlich direkt	581
Untersuchungen von Krebs auf molekularer Ebene	582
Zusammenfassung	583
Literatur	584

GLOSSARIUM	586
------------	-----

SACHREGISTER	605
--------------	-----



# 1

## DAS MENDELSCHÉ WELTBILD

Man neigt dazu, den Menschen als einzigartig unter allen lebenden Organismen zu betrachten. Er allein hat hochentwickelte Sprachen hervorgebracht, die einen sinnvollen und komplexen Austausch von Ideen und Gefühlen ermöglichen. Große Zivilisationen haben sich entwickelt und unsere Umgebung auf eine Weise verändert, wie sie für keine andere Art von Lebewesen vorstellbar ist. Es bestand daher immer die Tendenz, dem Menschen eine Sonderstellung einzuräumen. Diese Anschauung fand ihren Niederschlag in den Religionen, in denen der Mensch den Ursprung seines Seins und damit durchführbare Regeln, nach welchen er sein Leben einrichten kann, zu finden sucht. Da jedes menschliche Leben zu einem bestimmten Zeitpunkt beginnt und endet, schien es nur natürlich anzunehmen, daß Menschen nicht schon immer existiert haben, sondern erst zu einem bestimmten Zeitpunkt erschaffen wurden, vielleicht gleichzeitig mit allen anderen Formen des Lebens.

Dieser Glaube wurde vor etwa hundert Jahren zum ersten Mal ernsthaft in Frage gestellt, als Darwin und Wallace ihre Evolutionstheorien entwickelten, die auf der Auswahl des Tüchtigsten beruhen. Sie behaupteten, daß die verschiedenen Formen des Lebens nicht konstant wären, sondern daß es ständig zu leichten Veränderungen bei Tieren und Pflanzen käme, von denen einige besser angepaßt wären und größere Überlebens- und Vermehrungschancen hätten. Zur Zeit, als diese Theorie aufgestellt wurde, kannten ihre Vertreter die Ursachen

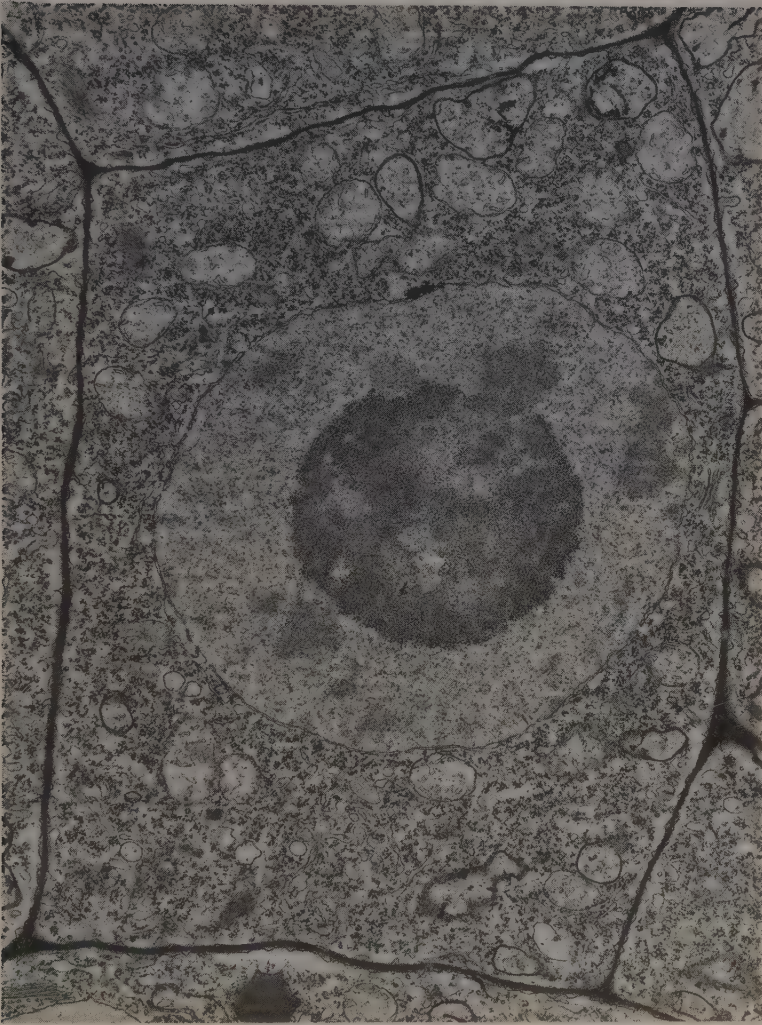
dieser ständigen Veränderungen nicht, aber sie erkannten richtig, daß die neuen Merkmale in der Nachkommenschaft erhalten bleiben mußten, wenn sie die Grundlage für eine Evolution darstellen sollten.

Am Anfang stieß die Theorie Darwins auf Empörung, vor allem bei denjenigen, die nicht glauben wollten, daß der Mensch und die eher obszön aussehenden Affen einen gemeinsamen Ahnen haben sollten, selbst wenn dieser Ahne vor einigen 50 oder 100 Millionen Jahren gelebt haben sollte. Es gab auch eine anfängliche Opposition von Seiten vieler Biologen, denen Darwins Argumente nicht überzeugend genug schienen. Zu ihnen gehörte auch der bekannte schweizer Naturforscher Agassiz, der damals in Harvard arbeitete und viele Jahre damit zubrachte, in seinen Schriften Darwin und dessen überzeugtesten Verteidiger, T. H. Huxley, den erfolgreichsten Verfechter der Evolutionstheorie, zu attackieren. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts waren jedoch die meisten wissenschaftlichen Streitigkeiten beigelegt; sowohl die gegenwärtige geographische Verteilung von Pflanzen und Tieren als ihr selektives Auftreten in den Fossilien der geologischen Vergangenheit konnten nur unter der Annahme erklärt werden, daß stetig in der Entwicklung begriffene Gruppen von Organismen einen gemeinsamen Ursprung hätten. Heute ist die Evolutionstheorie von allen außer einigen wenigen Fundamentalisten als Tatsache anerkannt, wobei die Gegnerschaft nicht auf logische Überlegung, sondern auf ein doktrinäres Festklammern an religiöse Prinzipien zurückzuführen ist.

Sobald man Darwins Theorie akzeptiert, ergibt sich als logische Folgerung die Erkenntnis, daß Leben auf unserer Erde zum ersten Mal vor etwa 1-2 Milliarden Jahren in einfacher Form existierte, möglicherweise den Bakterien ähnlich, der einfachsten Form von Leben überhaupt, die wir heute kennen. Eben die Existenz dieser kleinen Bakterien zeigt uns ja, daß alles Wesentliche des Zustands, den wir als Leben bezeichnen, schon in sehr kleinen Organismen gefunden werden kann. Die Evolutionstheorie greift aber noch tiefer in unser Denken ein, da sie die Idee in sich trägt, daß die Grundprinzipien des Lebens in allen lebenden Formen gleich sind.

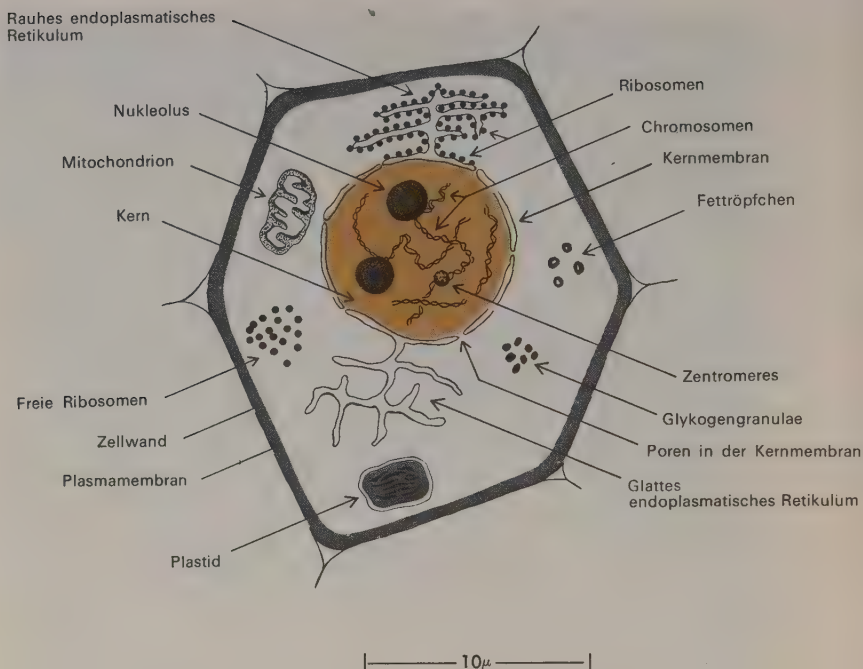
## DIE ZELLTHEORIE

Zum gleichen Schluß führte ganz unabhängig auch das zweite große biologische Prinzip des 19. Jahrhunderts, die Zelltheorie. Diese Theorie wurde zum ersten Mal 1839 von den deutschen Mikroskopikern Schleiden und Schwann in überzeugender Form vorgeschlagen. Sie besagt, daß alle Pflanzen und Tiere aus kleinen Grundeinheiten — den Zellen — aufgebaut sind. Alle Zellen sind von einer Membran umgeben und enthalten gewöhnlich einen Einschlußkörper, den Zellkern, der seinerseits ebenfalls von einer Membran,



**ABBILDUNG 1-1** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnitts durch eine Zelle des afrikanischen Veilchens. Man sieht deutlich die dünne primäre Zellulose-Zellwand und den Kern mit einem deutlichen Nukleolus. Die zytoplasmatische Grundsubstanz ist voll von sphärischen Partikeln, den Ribosomen, die als schwarze Punkte erscheinen. Die Profile eines Netzwerks hohler Membranen, des endoplasmatischen Retikulums, kann man über die ganze Zelle verteilt wahrnehmen. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. K. R. Porter und Dr. M. C. Ledbetter, Biological Laboratories, Universität Harvard.)





**ABBILDUNG 1-2** Schematische Darstellung der Pflanzenzelle aus Abbildung 1-1. Die verschiedenen Komponenten sind nicht immer maßstabgetreu wiedergegeben.

der Kernmembran, umgeben ist (Abbildungen 1-1 und 1-2). Das wichtigste dabei ist, daß Zellen nur aus anderen Zellen entstehen und zwar durch Zellteilung. Die meisten Zellen besitzen die Fähigkeit, zu wachsen und sich ungefähr zu gleichen Teilen in zwei Tochterzellen zu spalten. Gleichzeitig teilt sich der Kern, so daß jede der Tochterzellen einen Zellkern mitbekommt.

### DIE ZAHL DER ELTERLICHEN CHROMOSOMEN BLEIBT WÄHREND DER MITOSE ERHALTEN

Jeder Zellkern enthält eine festgesetzte Anzahl linearer Teilchen, die man Chromosomen nennt (Abbildung 1-3). Vor der Zellteilung teilt sich jedes Chromosom unter Bildung zweier Chromosomen, die mit den ursprünglichen völlig identisch sind. Bei diesem Vorgang, der zum ersten Mal von Flemming 1879 richtig beobachtet wurde, verdoppelt sich die Zahl der Chromosomen im Kern. Während der Kernteilung wandert je ein Strang des Tochterchromosomenpaares in je einen Tochterkern (Abbildung 1-4). Das Ergebnis dieser

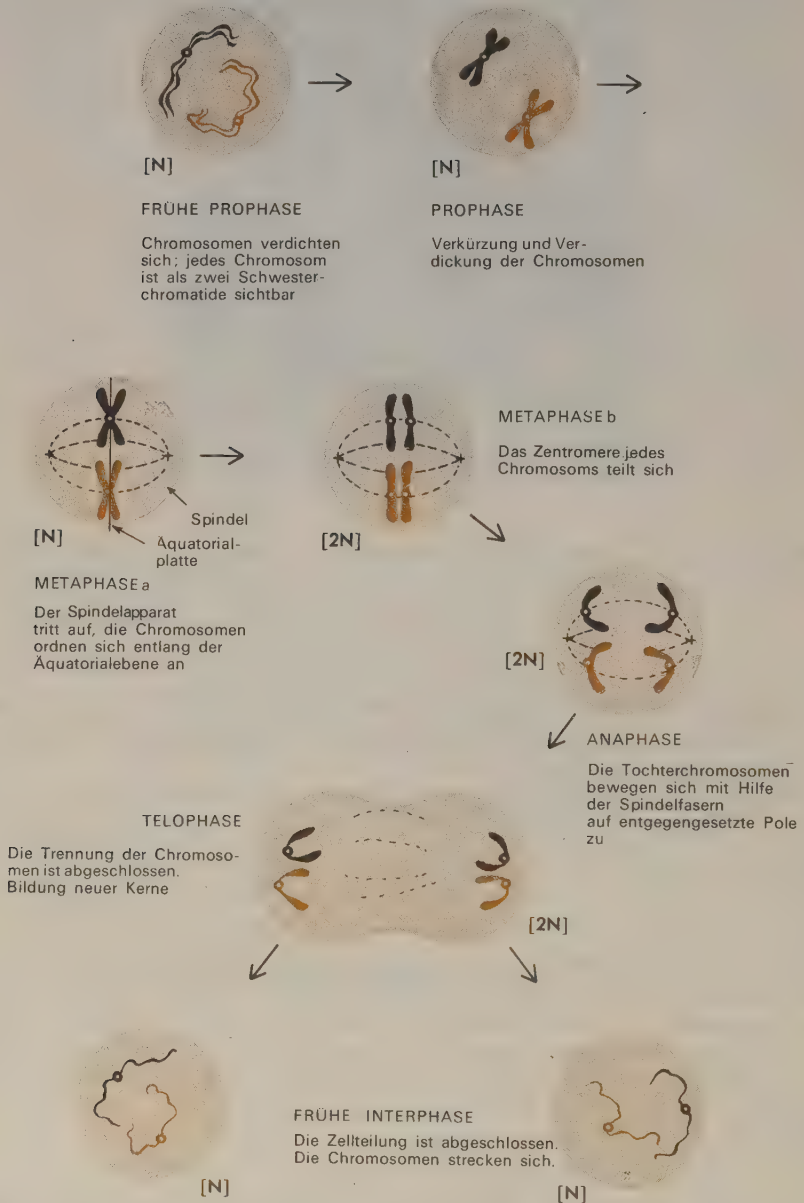


**ABBILDUNG 1-3** *Der haploide Chromosomensatz des Leopardenfrosches (*Rana pipiens*), 2125-fach vergrößert. Die Aufnahme wurde mit einem Lichtmikroskop von T. E. Powell, Biological Laboratories, Univ. Harvard, gemacht. Sie zeigt Chromosomen, die sich schon zum Chromatiden verdoppelt haben und durch ein einziges Zentromeres zusammengehalten werden.*

Vorgänge, die man heute zusammenfassend Mitose nennt, ist, daß die jeweiligen Chromosomenzahlen der Tochterzellen im allgemeinen mit denen der Mutterzelle identisch sind.

Während des Großteils der Lebenszeit einer Zelle existieren die Chromosomen in äußerst gestreckter Form. Vor der Zellteilung jedoch ziehen sie sich dicht zusammen. Die Verdoppelung der Chromosomen geht hauptsächlich im gestreckten Zustand vor sich, der für die Interphase charakteristisch ist (die verschiedenen Schritte der Zellteilung sind in Abbildung 1-4 definiert). Es gibt aber einen Teil des Chromosoms, der sich immer während des kontrahierten Zustands, der Metaphase, verdoppelt; diesen Teil nennt man das Zentromere. Es kontrolliert die Bewegung des Chromosoms während der Zellteilung. Das Zentromere ist für ein bestimmtes Chromosom immer an der gleichen Stelle lokalisiert. Der jeweilige Lokalisationspunkt variiert jedoch von Chromosom zu Chromosom; bei manchen liegt er nahe dem Ende, bei anderen mehr zur Mitte zu.

Hat sich ein Chromosom mit Ausnahme des Zentromers vollständig verdoppelt, so spricht man von zwei Chromatiden. Ein Chromatid wandelt sich in ein Chromosom um, sobald das Zentromere sich geteilt hat und nicht mehr zwei Chromatiden gemeinsam angehört. Sobald aus einem Zen-



**ABBILDUNG 1-4** Schematische Darstellung der Mitose im Zellkern einer haploiden Zelle mit zwei nicht homologen Chromosomen.



tromeren zwei geworden sind, beginnen die beiden Tochterchromosomen sich voneinander zu entfernen.

Die gleichmäßige Anordnung der Chromosomen während der Metaphase ist vom Auftreten der Spindel begleitet. Darunter versteht man eine Region in der Zelle, die wie eine Spindel geformt ist und durch die die Chromosomen höherer Organismen sich während der Anaphase voneinander entfernen. Der Großteil der Spindelregion ist von langen, dünnen Fasern ausgefüllt, die nach Ansicht mancher Leute den kontraktilen Proteinen der Muskeln ähnlich sind. Falls diese Ähnlichkeit echt ist, könnte vielleicht der gleiche Mechanismus, der der Kontraktion der Muskeln zugrunde liegt, auch die Bewegung der Chromosomen durch die Spindel kontrollieren.

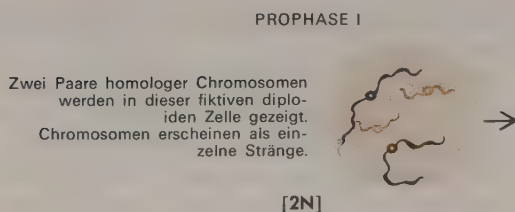
Im Kern praktisch aller pflanzlichen und tierischen Zellen sind auch die sogenannten Nukleoli enthalten. Es gibt häufig einen Nukleolus pro haploidem Chromosomensatz; bei manchen Zellen ist der Nukleolus mit einem bestimmten Chromosom assoziiert. Bis vor kurzem war die Funktion des Nukleolus völlig unbekannt, obwohl einige Biologen ursprünglich annahmen, daß er mit der Bildung der Spindel zu tun habe. Es gibt jetzt aber einige starke Hinweise dafür, daß der Nukleolus an der Synthese der Ribosomen beteiligt ist, kleiner Zellpartikeln, an denen alle Proteine synthetisiert werden.

#### BEI DER MEIOSE WIRD DIE ELTERLICHE CHROMOSOMENZAHL REDUZIERT

Man kennt eine wichtige Ausnahme von der Regel der Mitose. Nach Beendigung der Zellteilungen, die zu den Geschlechtszellen, Spermium und Ei, führen (Meiose), ist die Chromosomenzahl auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes reduziert (Abbildung 1-5). In höheren Pflanzen und Tieren liegt normalerweise jede spezifische Chromosomensorte in zwei Exemplaren vor, die man homologe Chromosomen nennt (diploider Zustand). Bei der Bildung der Geschlechtszellen bekommen Spermium und Ei nur jeweils eines der zwei Exemplare mit (haploider Zustand). Die Vereinigung von Spermium und Ei während der Befruchtung führt zu einem befruchteten Ei (Zygote), das ein homologes Chromosom des männlichen und eines des weiblichen Elternteiles enthält. Der normale diploide Chromosomensatz wird so wieder hergestellt.

Während die meisten Zellen höherer Pflanzen und Tiere diploid sind, ist der haploide Zustand bei niederen Pflanzen und Tieren der weitaus häufigere; hier tritt Diploidie nur intermediär unmittelbar nach der Verschmelzung der Geschlechtszellen auf. Im allgemeinen folgt die Meiose fast unmittelbar der Befruchtung und führt damit wieder zu haploiden Zellen (Abbildung 1-6).

Die Zelltheorie besagt also, daß alle Zellen aus bereits vorhandenen



**ABBILDUNG 1-5** Schematische Darstellung der Meiose in der Zelle eines Organismus, der zwei Paare homologer Chromosomen enthält.

Zellen hervorgehen. Somit entstehen alle Zellen einer ausgewachsenen Pflanze oder eines Tieres durch Teilung und Wachstum des befruchteten Eies, welches seinerseits durch Vereinigung zweier anderer Zellen entstanden ist, aus Spermium und Ei. Alle im Wachstum begriffenen Zellen enthalten Chromosomen, im allgemeinen zwei von jeder Sorte; auch hier entstehen neue Chromosomen nur durch Teilung der bereits vorher bestehenden.

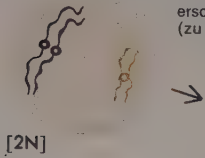
## DIE ZELLTHEORIE IST ALLGEMEIN ANWENDBAR

Obwohl die Zelltheorie sich aus Beobachtungen, die an höheren Organismen gemacht wurden, entwickelte, gilt sie mit gleicher Strenge auch für einfachere Formen des Lebens wie Protozoen und Bakterien. Jedes Bakterium oder Protozoon besteht aus einer einzigen Zelle, deren Teilung gewöhnlich zu einer neuen Zelle führt, die der elterlichen in allen Punkten gleicht und die sich von dieser bald trennt. In höheren Organismen hingegen bleiben die Tochterzellen nicht nur oft beisammen, sondern sie differenzieren sich sogar häufig zu völlig verschiedenen Zelltypen (wie z.B. Nerven- oder Muskelzellen), wobei die Chromosomengesamtzahl der Zygoten erhalten bleibt. In diesem Fall entstehen neue Organismen aus den hoch differenzierten Zellen Spermium und Ei, deren Vereinigung den Beginn eines neuen Zyklus von Teilung und Differenzierung einleitet.

Obwohl also ein so komplizierter Organismus wie der Mensch aus einer großen Vielzahl von Zellen besteht (bis zu  $5 \times 10^{12}$ ), entstehen diese ursprünglich alle aus einer einzigen Zelle. Das befruchtete Ei enthält die gesamte Information, die für das Wachstum und die Entwicklung einer erwachsenen Pflanze oder eines Tieres erforderlich ist. Auch hier ist also die komplizierte Wechselwirkung, die in hoch organisierten Organismen besteht, für den Zustand des Lebens an sich nicht notwendig; seine wesentlichen Eigenschaften können in einzelnen wachsenden Zellen gefunden werden.

PROPHASE I a

Homologe Chromosomen paaren sich. Später erscheint jedes Chromosom als zwei Chromatide (zu diesem Zeitpunkt kommt es zum Crossing-Over).



METAPHASE I

Orientierung der gepaarten Chromosomen in der Äquatorialebene. Bildung des Spindelapparates.



[4N]

ANAPHASE I

Homologe Zentromere bewegen sich auf entgegengesetzte Pole der Spindel zu. Telophase I folgt; sie stellt die erste meiotische Teilung dar.



[4N]

ERSTE MEIOTISCHE TEILUNG

Die Kernmembran bildet sich. Die Chromosomen strecken sich.



[2N]



INTERPHASE II

Prophase II und Metaphase II.

Die Zentromeren teilen sich, gefolgt von der Wanderung homologer Chromatide an entgegengesetzte Pole.



[2N]



ANAPHASE II

Zweite meiotische Teilung

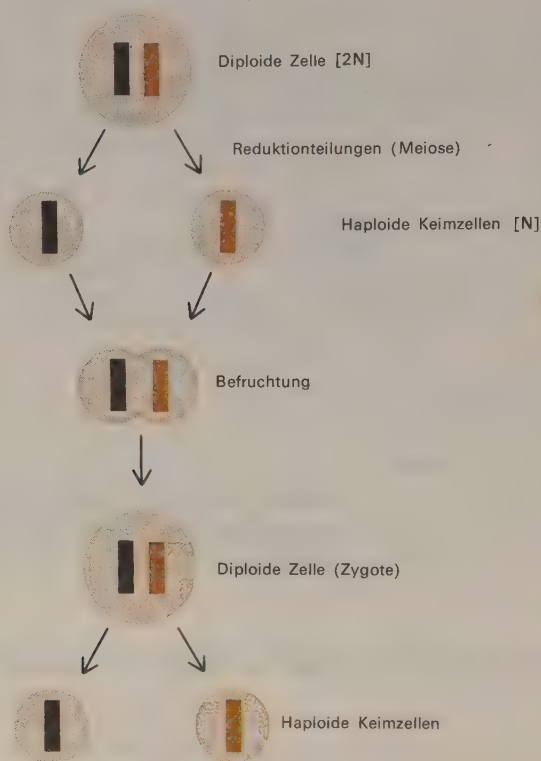


[N]



Das Endergebnis ist die Bildung von vier haploiden Zellen.





**ABBILDUNG 1-6** Schematische Darstellung des abwechselnd haploiden und diploiden Zustands im Geschlechtszyklus. Der Chromosomensatz des einen Elternteils ist schwarz gezeichnet, der des anderen Elternteils ist farbig.

## DIE MENDELSCHEN GESETZE

Das auffallendste Merkmal einer Zelle ist ihre Fähigkeit, vererbare Eigenschaften von einer Zellgeneration an die nächste weiterzugeben. Daß es so etwas wie Vererbung gibt, muß den Menschen schon sehr früh aufgefallen sein, als sie sahen, daß bestimmte Eigenschaften, wie Augen- oder Haarfarbe, von den Eltern auf die Nachkommen übertragen wurden. Die Grundlagen dieses Phänomens blieben allerdings bis in die frühen Jahre des 20. Jahrhunderts unverstanden, als in einer bemerkenswerten Periode schöpferischer Aktivität die chromosomale Theorie der Vererbung ausgearbeitet wurde.

Die Weitergabe vererbbarer Eigenschaften mittels Spermium und Ei wurde um 1860 bekannt; 1868 postulierte Haeckel, der beobachtet hatte, daß Sper-

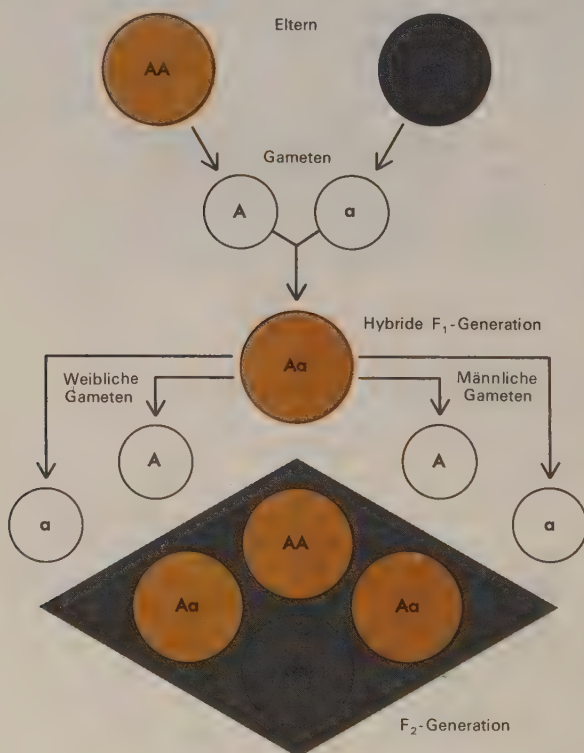
mien hauptsächlich aus Kernmaterial bestehen daß der Kern für die Vererbung maßgeblich sei. Es vergingen aber noch fast 20 Jahre bis die Chromosomen als aktive Faktoren erkannt wurden, da die Einzelheiten von Mitose, Meiose und Befruchtung erst ausgearbeitet werden mußten. Als das erreicht war, sah man, daß die Chromosomen, im Gegensatz zu anderen Kernbestandteilen, zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen werden. Zusätzlich wurden nun auch die komplizierten chromosomalen Veränderungen verständlich, durch die die Zahl der Chromosomen in Spermium und Ei während der Meiose auf die Hälfte reduziert wird, da sie ja für die Konstanzhaltung der Chromosomenzahlen notwendig waren. Diese Tatsachen ließen jedoch lediglich vermuten, daß Chromosomen für die Vererbung notwendig wären. Die Beweise dafür brachte erst die Jahrhundertwende mit der Entdeckung der grundlegenden Regeln der Vererbung. Diese Regeln, die nach ihrem ursprünglichen Entdecker Mendel benannt wurden, waren tatsächlich schon 1865 vorgeschlagen worden, aber das wissenschaftliche Klima dieser Zeit war für ihre Annahme noch nicht reif. Bis 1900 wurden sie völlig ignoriert, trotz einiger früher Versuche Mendels, die bedeutendsten Biologen seiner Zeit für sie zu interessieren. Dann erkannten jedoch de Vries, Correns und Tschermak unabhängig voneinander die große Bedeutung der Mendelschen Arbeiten, die in Vergessenheit geraten waren. Alle drei waren Pflanzenzüchter, die ähnliche Versuche wie Mendel durchführten, und jeder von ihnen kam ohne vorherige Kenntnis der Mendelschen Arbeiten zu ähnlichen Ergebnissen.

## GESETZ DER UNABHÄNGIGEN SEGREGATION

Mendel verfolgte die Ergebnisse von Züchtungsversuchen (genetischen Kreuzungen) zwischen Erbsenstämmen, die sich in klar definierten Eigenschaften voneinander unterschieden, wie z.B. Samenform (glatt oder runzlig), Samenfarbe (gelb oder grün), Schotenform (aufgeblasen oder runzlig) und Stengelänge (lang oder kurz). Es war von großer Bedeutung, daß er sich auf gut definierte Unterschiede konzentrierte; viele Züchter hatten schon früher versucht, die Vererbbarkeit gröberer Merkmale, wie z.B. das Gesamtgewicht eines Organismus, zu verfolgen, konnten aber keine einfachen Regeln über die Weitergabe von den Eltern auf die Nachkommenschaft finden. Nachdem Mendel festgestellt hatte, daß jeder der Elternstämme sich rein vererbte (das heißt, Nachkommenschaft hervorbrachte, die die gleichen Merkmale wie die Eltern besaßen), kreuzte er Elternstämme (P, parental), die sich in einer einzigen Eigenschaft voneinander unterschieden (z.B. Samenform oder Samenfarbe). Die gesamte Nachkommenschaft ( $F_1$  = erste Tochtergeneration - F für «filial») glich einem der beiden Elternteile. Zum Beispiel hatte

nach einer Kreuzung zwischen Erbsen mit gelben Samen und Erbsen mit grünen Samen die gesamte Nachkommenschaft gelbe Samen. Die Eigenschaft, die in der Nachkommenschaft erscheint, nennt man dominant, wogegen die, die in der  $F_1$ -Generation nicht hervortritt, rezessiv genannt wird.

Als Mendel die  $F_1$ -Generation kreuzte, wurde klar, was diese Ergebnisse bedeuteten. Diese Kreuzungen führten zu dem außerordentlich wichtigen Ergebnis, daß das rezessive Merkmal in ungefähr 25% der Nachkommenchaft wieder auftrat, während 75% das dominante Merkmal zeigten. Bei jedem der sieben Merkmale, die er verfolgte, war das Verhältnis von dominant zu rezessiv in der  $F_2$ -Generation immer ungefähr 3:1. Wenn diese Versuche auf die dritte Generation ( $F_3$ ) ausgedehnt wurden, vererbten sich alle Erbsen, die die rezessiven Eigenschaften aufwiesen, rein weiter, das heißt, sie produ-



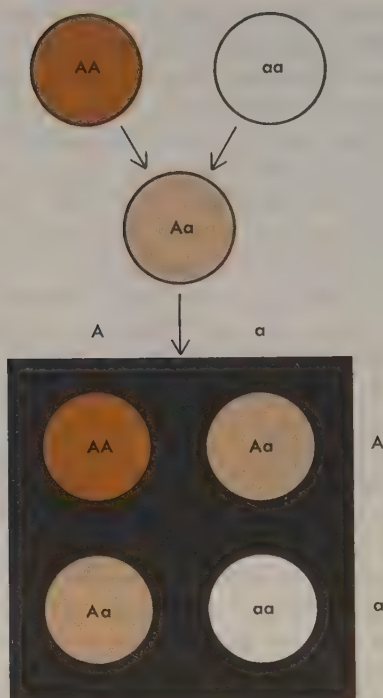
**ABBILDUNG 1-7** Erklärung des 3:1 Verhältnisses zwischen dominanten und rezessiven Phänotypen in der  $F_2$ -Generation mit Hilfe des Ersten Mendelschen Gesetzes (unabhängige Segregation). ( $A$ ) stellt das dominante und ( $a$ ) das rezessive Gen dar. Die schattierten Kreise stellen Dominanz, die grauen Kreise den rezessiven Phänotyp dar.



zierten Nachkommen mit den rezessiven Merkmalen. Diejenigen, die die dominanten Merkmale aufwiesen, zerfielen in zwei Gruppen: ein Drittel vererbte sich rein weiter, das heißt, führte nur zu Nachkommenschaft mit den dominanten Merkmalen; die beiden restlichen Drittel lieferten wieder eine gemischte Nachkommenschaft im Verhältnis 3:1 zwischen den dominanten und rezessiven Merkmalen. Mendel interpretierte seine Ergebnisse richtig auf folgende Weise (Abbildung 1-7): die verschiedenen Merkmale werden von einem Faktorenpaar kontrolliert (wir nennen diese Faktoren heute Gene); ein Faktor stammt vom männlichen, der andere vom weiblichen Elternteil. Zum Beispiel enthalten reinerbige Stämme von runden Erbsen zwei Gene für 'Rund' (RR), wogegen reinerbige runzlige Stämme zwei Gene für 'Runzlig' (rr) enthalten. Die Gameten der runden Stämme haben je ein Gen für 'Rund' (R); die runzligen Stämme enthalten in ihren Gameten je ein Gen für 'Runzlig' (r). Bei der Kreuzung zwischen (RR) und (rr) führt die Befruchtung zu einer  $F_1$  Pflanze, die beide Gene (Rr) trägt. Der Erbsensamen sieht rund aus, weil R über r dominant ist. Man nennt das Aussehen, die äußere Struktur eines Individuums, seinen Phänotyp, und seine genetische Zusammensetzung den Genotyp. Organismen mit gleichen Phänotypen können also verschiedene Genotypen besitzen; um den Genotyp zu bestimmen, ist es daher häufig notwendig, genetische Kreuzungen über mehrere Generationen hinweg durchzuführen. Der Ausdruck homozygot bezeichnet ein Genpaar, in dem das mütterliche und das väterliche Gen identisch sind (z.B. RR oder rr). Im Gegensatz dazu werden Genpaare, in denen die mütterlichen Gene verschieden von den väterlichen Genen sind, (z.B. Rr) heterozygot genannt.

Es ist wichtig, zu beachten, daß ein gegebener Gamet nur eines der beiden Gene des Organismus, aus dem er stammt, trägt (z.B. entweder R oder r, niemals aber beide) und daß die beiden Arten von Gameten in gleicher Anzahl vorkommen. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein gegebener Gamet von  $F_1$ -Erbsen ein bestimmtes Gen (R oder r) enthält, ist also 50:50. Die Auswahl ist völlig zufällig. Wenn man eine begrenzte Zahl von  $F_2$ -Nachkommen untersucht, kann man nicht erwarten, daß man genau ein Verhältnis von 3:1 findet. Das Verhältnis wird manchmal etwas größer und manchmal etwas kleiner sein. Wenn man jedoch eine wachsende Anzahl untersucht, so darf man erwarten, daß das Verhältnis von Erbsen mit dominanten Merkmalen zu solchen mit rezessiven Merkmalen sich immer mehr dem Verhältnis von 3:1 nähert.

Das Wiederauftreten der rezessiven Merkmale in der  $F_2$ -Generation zeigt, daß rezessive Gene während der Hybridgeneration (Rr) weder verändert wurden noch verloren gingen, sondern daß das dominante und das rezessive Gen unabhängig voneinander weitergegeben werden und während der Bildung der Geschlechtszellen unabhängig voneinander segregieren können.



**ABBILDUNG 1-8** Die Vererbung der Blütenfarbe beim Löwenmaul. Ein Elternteil ist homozygot für rote Blüten ( $AA$ ), der andere homozygot für weiße Blüten ( $aa$ ). Es gibt keine Dominanz und die heterozygoten Blüten sind rosa. Das Verhältnis der roten: rosa: weißen Blüten ( $1:2:1$ ) ist durch die verschiedenen Farbschattierungen angedeutet.

Dieses Prinzip der unabhängigen Segregation wird oft als das 'Erste Mendelsche Gesetz' bezeichnet.

### MANCHE GENE SIND WEDER DOMINANT NOCH REZESSIV

Bei den Kreuzungsversuchen, über die Mendel berichtete, war jeweils eines der beiden Genpaare eindeutig dominant, das andere rezessiv. Das ist jedoch nicht immer der Fall. Manchmal befindet sich der heterozygote Phänotyp in der Mitte zwischen den beiden homozygoten Phänotypen. Kreuzt man z.B. ein reinerbiges rotes Löwenmaul (*Antirrhinum*) mit einer reinerbigen weißen Abart, so zeigen die Blüten der  $F_1$ -Nachkommenschaft die intermediäre rosa Farbe. Wenn die  $F_1$ -Abkömmlinge untereinander gekreuzt werden,

zeigt die  $F_2$ -Generation rote, rosa und weiße Blüten im Verhältnis 1:2:1 (Abbildung 1-8). Hier ist es also möglich, die Heterozygoten von den Homozygoten aufgrund des Phänotyps zu unterscheiden. Man sieht außerdem, daß die Gültigkeit der Mendelschen Gesetze nicht davon abhängt, daß ein Gen eines Genpaares über das andere dominiert.

## DAS PRINZIP DER UNABHÄNGIGEN KOMBINATIONSFÄHIGKEIT VON GENEN

Mendel dehnte seine Züchtungsversuche auf Erbsen aus, die sich in mehr als einem Merkmal voneinander unterschieden. Auch hier begann er mit zwei Erbsenstämmen, die, mit sich selbst gepaart, reinerbig waren. Einer der Stämme hatte runde gelbe Samen, der andere runzlige grüne. Da rund und gelb über runzlig und grün dominieren, brachte die gesamte  $F_1$ -Generation runde gelbe Samen hervor. Die  $F_1$ -Nachkommenschaft wurde sodann untereinander gekreuzt und führte zu einer  $F_2$ -Nachkommenschaft, die auf das Aussehen des Samens hin untersucht wurde (Phänotyp). Zusätzlich zu den ursprünglichen Phänotypen (rund, gelb; runzlig, grün) traten zwei neue Typen (Rekombinanten) auf; runzlig, gelb und rund, grün.

Mendel fand, daß er auch diese Ergebnisse mit Hilfe der Genhypothese erklären konnte, falls er annahm, daß bei der Bildung der Geschlechtszellen jedes Genpaar unabhängig an die Geschlechtszelle weitergegeben wird. Diese Interpretation ist in Abbildung 1-9 schematisch dargestellt. Jeder einzelne Gamet enthält nur eine Art von Erbfaktor von jedem Genpaar. Daher haben die Gameten, die von der  $F_1$ -Generation ( $RrYy$ )<sup>1</sup> stammen, die Zusammensetzung  $RY$ ,  $Ry$ ,  $rY$  oder  $ry$ , niemals aber  $Rr$ ,  $Yy$ ,  $YY$  und  $RR$ . Außerdem treten in diesem Beispiel alle vier möglichen Gameten gleich häufig auf. Die Gene eines Elternteiles zeigen keinerlei Tendenz, beisammen zu bleiben.

Die Phänotypen der  $F_2$ -Generation treten also im Verhältnis 9 rund gelb, 3 rund grün, 3 runzlig gelb und 1 runzlig grün auf. Dieses Phänomen der unabhängigen Kombinationsfähigkeit von Genen wird oft als 2. Mendelsches Gesetz bezeichnet.

## CHROMOSOMALE THEORIE DER VERERBUNG

Ein wesentlicher Grund dafür, daß die Mendelschen Entdeckungen ursprünglich nicht voll gewürdigt werden konnten war, daß genaue Kenntnisse

<sup>1</sup> Anm. d. Übersetzers: Um Verwechslungen zwischen gelb und grün zu vermeiden, wurde die Abkürzung  $Y$  (= yellow, gelb) aus dem Englischen übernommen.



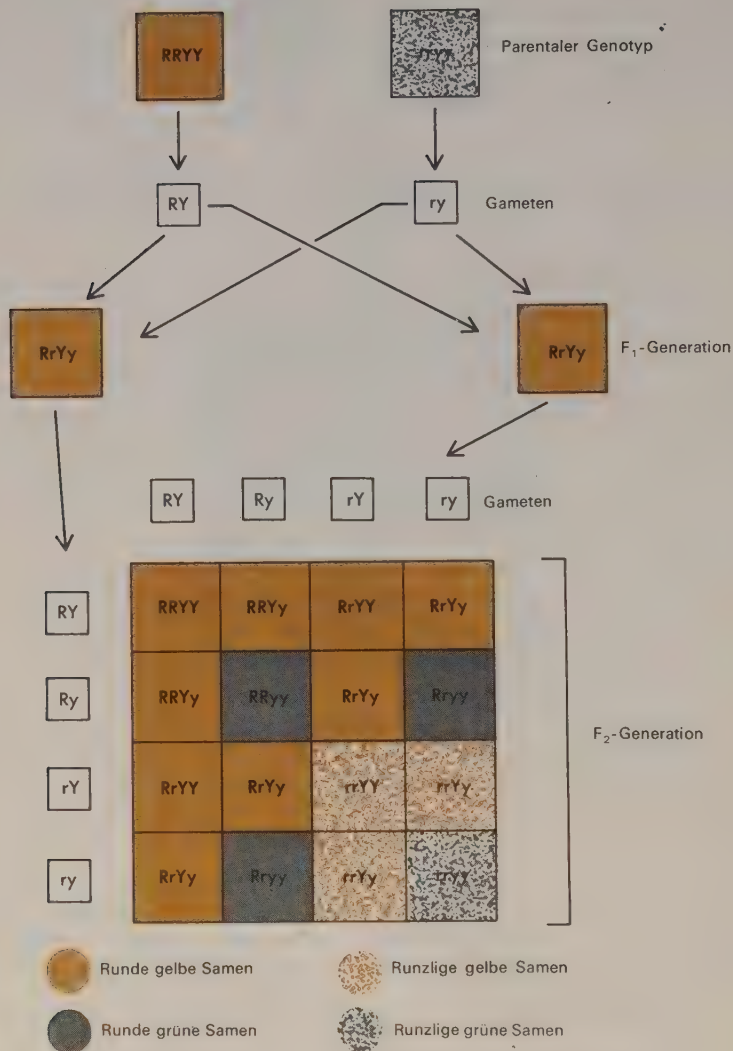


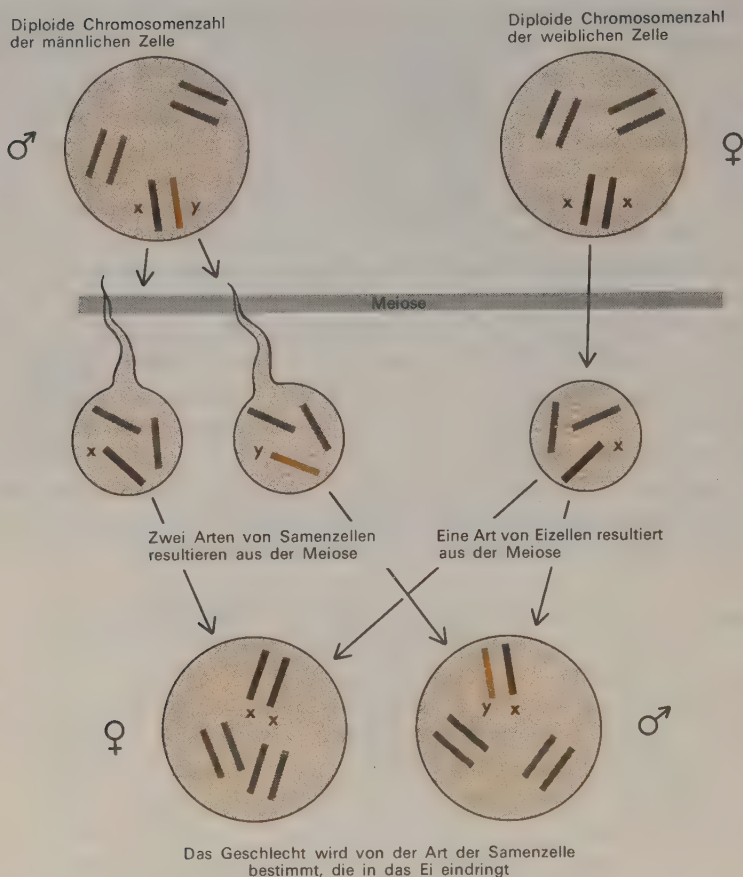
ABBILDUNG 1-9

Schematische Darstellung des Zweiten Mendelschen Gesetzes (unabhängige Kombinierbarkeit von Genen). In diesem Beispiel wurde die Vererbung von gelben (Y) und grünen (y) Samenfarben zusammen mit runder (R) oder runzlicher (r) Samenform verfolgt. Die Allele (Y) und (R) sind über (y) und (r) dominant. Die Genotypen der betreffenden Elternteile und der Nachkommenschaft sind durch Buchstabenkombinationen angedeutet, die vier verschiedenen Phänotypen sind durch geeignete Schattierungen unterschieden.

über das Verhalten von Chromosomen während der Meiose und Mitose noch fehlten. Diese Kenntnisse lagen jedoch vor, als man die Mendelschen Gesetze um 1900 neu formulierte und sie wurden von dem Amerikaner Sutton um 1903 erneut aufgegriffen. In seiner klassischen Veröffentlichung «The Chromosomes in Heredity» betonte er die Bedeutung der Tatsache, daß die diploiden Chromosomensätze aus zwei morphologisch ähnlichen Anteilen bestehen und daß während der Meiose jeder Gamet nur ein Chromosom des homologen Paares erhält. Er zog diese Erkenntnisse zur Erklärung der Mendelschen Ergebnisse heran, indem er annahm, daß Gene Teile von Chromosomen wären. Er postulierte, daß ein bestimmtes Chromosomenpaar die Gene für gelbe und grüne Samenfarbe trüge und daß die Gene für rund und gerunzelt auf einem anderen Chromosom lokalisiert seien. Diese Hypothese erklärt unmittelbar das experimentell gefundene Segregationsverhältnis von 9:3:3:1. Obwohl Suttons Arbeit die chromosomale Theorie der Vererbung nicht direkt bewies, war sie doch von außerordentlicher Bedeutung; zum ersten Mal hatte sie eine Verbindung zwischen unabhängigen Disziplinen hergestellt: der Genetik (dem Studium von Züchtungsergebnissen) und der Zytologie (der Untersuchung von Zellstrukturen).

#### BESTIMMUNG DES GESCHLECHTS DURCH CHROMOSOMEN

Es gibt eine wichtige Ausnahme von der Regel, daß alle Chromosomen diploider Organismen in zwei Kopien vorkommen. Schon 1890 war beobachtet worden, daß ein Chromosom (damals das zusätzliche, heute das X-Chromosom genannt) nicht immer einen morphologisch identischen Partner besitzt. Die biologische Bedeutung dieses Befundes wurde 1905 von dem amerikanischen Zytologen Wilson und seinem Schüler Stevens klar gemacht. Sie zeigten, daß das X-Chromosom in männlichen Zellen nur einmal vorkommt, während weibliche Zellen ein Paar davon besitzen. Zusätzlich enthalten männliche Zellen mancher Spezies einschließlich des Menschen, ein besonderes Chromosom, das in weiblichen Zellen nicht gefunden wird. Man nennt es das Y-Chromosom. Sie wiesen darauf hin, daß damit ein einfacher Weg zur Bestimmung des Geschlechts gegeben sei; denn obwohl jedes Ei ein X-Chromosom enthält, tritt dieses nur bei der Hälfte aller männlichen Keimzellen auf. Befruchtung eines Eis mit einem Samen, der ein X-Chromosom trägt, führt zu einer XX-Zygote und damit zu weiblicher Nachkommenschaft; Befruchtung mit einem Samen, dem der X-Faktor fehlt, führt zu männlichen Nachkommen (Abbildung 1-10). Dieser Befund stellte die erste eindeutige Verknüpfung eines bestimmten Chromosoms mit einer Erbeigenschaft dar. Zusätzlich konnten die Autoren elegant erklären, durch welchen Mechanismus weibliche und männliche Zygoten in gleicher Zahl entstehen.



**ABBILDUNG 1-10** Schematische Darstellung der Funktionsweise von Geschlechtschromosomen. Hier wird ein Fall gezeigt, in dem die männlichen Zellen ein X- und ein Y-Chromosom tragen und die weiblichen zwei X-Chromosomen. Dies trifft sowohl für den Menschen als auch für die *Drosophila* zu. Manche anderen Arten besitzen kein Y-Chromosom, sodaß die diploiden männlichen Zellen ein Chromosom weniger als die diploiden weiblichen Zellen enthalten.

## DIE BEDEUTUNG VON DROSOPHILA

Ursprünglich stützten sich alle Züchtungsversuche auf genetische Unterschiede, die in der Natur bereits vorhanden waren. So verwendete Mendel Samen, die er von Samenhändlern bekommen hatte, die sie ihrerseits wohl von Bauern bezogen hatten. Die Existenz verschiedener Formen des selben Gens



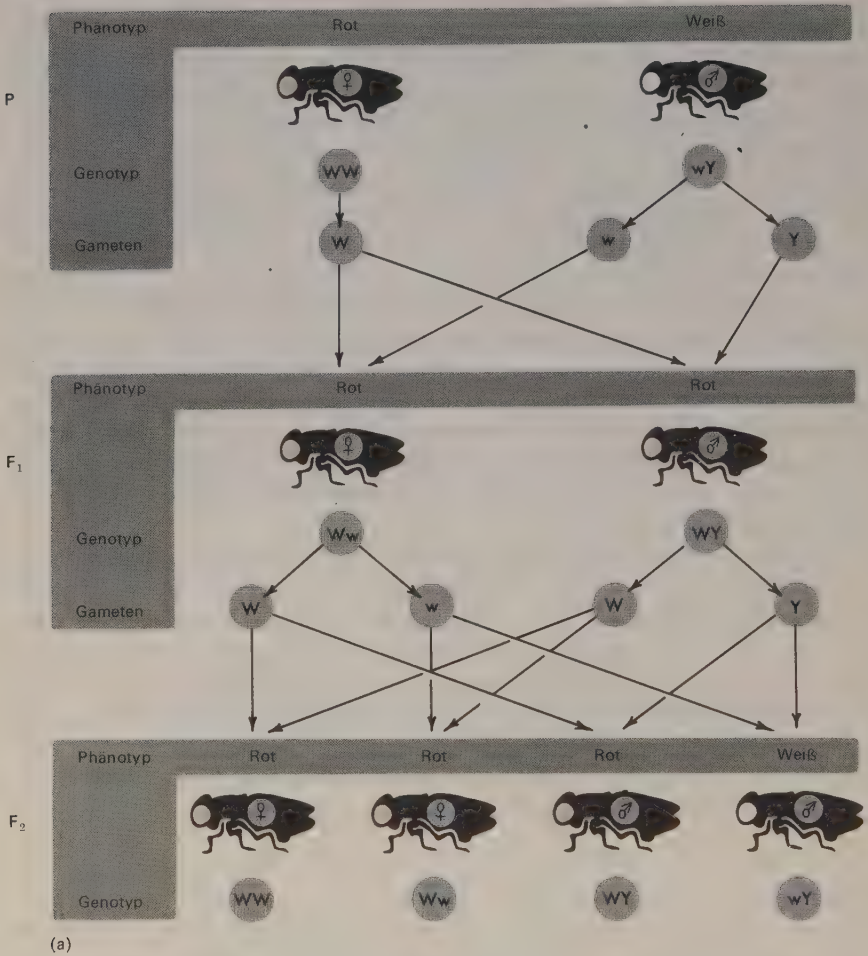
(Allele) führt zu der Frage nach ihrer Entstehung. Eine offensichtliche Erklärungsmöglichkeit wäre die Annahme, daß Gene sich verändern (mutieren) können und so Anlaß zu neuen Genen (Mutantengen) geben. Der große amerikanische Biologe Morgan begann 1908 zusammen mit seinen jungen Mitarbeitern, den Genetikern Bridges, Muller and Sturtevant, diese Hypothese genauer zu untersuchen. Sie arbeiteten mit der kleinen Fliege *Drosophila*. Man fand, daß diese Fliege, die normalerweise auf Früchten lebt, leicht im Laboratorium gehalten werden kann, wo sie alle 14 Tage eine neue Generation hervorbringt. Es war daher unter Verwendung von *Drosophila* an Stelle sich langsamer vermehrender Organismen wie Erbsen möglich, ungefähr 25 mal so rasch und außerdem wesentlich ökonomischer zu arbeiten. Die erste Mutante, die gefunden wurde, war ein Männchen mit weißen statt der üblichen roten Augen. Sie trat spontan in einer Kultur rotäugiger *Drosophila*-fliegen auf. Da fast alle in der Natur gefundenen *Drosophila*-fliegen rote Augen haben, wurde das Gen, das zur Rotäugigkeit führt, das Wildtyp-Gen genannt; das Gen, das weiße Augen hervorbringt wurde als Mutantengen (Allel) bezeichnet.

Das Gen für 'weiße Augen' wurde sofort zu Züchtungsversuchen herangezogen (Abbildung 1-11 a und b) und lieferte das überraschende Ergebnis, daß das Verhalten des Allels völlig analog zu dem des X-Chromosoms war; das heißt, es war geschlechtsgebunden. Diese Ergebnisse wiesen unmittelbar darauf hin, daß dieses Gen möglicherweise zusammen mit den Genen, die das Geschlecht bestimmen, auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Die Hypothese wurde rasch durch zusätzliche genetische Kreuzungen bestätigt, in denen man neu entdeckte Mutantengene untersuchte. Viele dieser zusätzlichen Mutantengene waren ebenfalls geschlechtsgebunden.

## GENKOPPLUNG UND CROSSING-OVER

Das Mendelsche Gesetz über die unabhängige Kombinierbarkeit von Genen beruht auf der Tatsache, daß sich Gene, die Teile verschiedener Chromosomen sind, während der Meiose unabhängig voneinander verhalten. Häufig segregieren Gene aber nicht unabhängig voneinander, da sie auf demselben Chromosom lokalisiert sind (gekoppelte Gene). Sobald eine größere Anzahl von Mutantengen für Züchtungsversuche zur Verfügung standen, fand man zahlreiche Beispiele, bei denen die Segregation nicht zufällig war. In jedem Fall, der sorgfältig untersucht wurde, war die Zahl der Kopplungsgruppen gleich der haploiden Chromosomenzahl. Zum Beispiel gibt es bei *Drosophila* 4 Gruppen von gekoppelten Genen und 4 morphologisch verschiedene Chromosomen in einer haploiden Zelle.

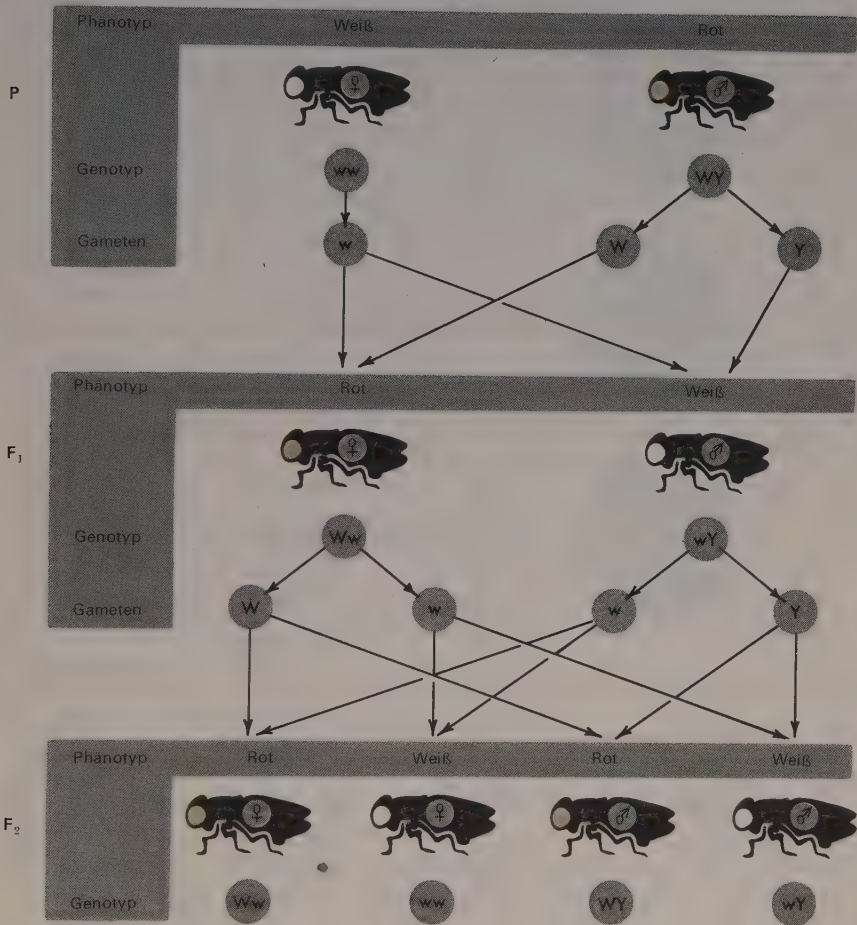
Die Kopplung ist in Wirklichkeit jedoch nie vollständig. Die Wahrchein-



**ABBILDUNG 1-11** Die Vererbung eines geschlechtsgebundenen Gens bei *Drosophila*. Gene, die auf Geschlechtschromosomen lokalisiert sind, können sich in der männlichen Nachkommenschaft anders ausdrücken als in der weiblichen; wenn nämlich nur ein X-Chromosom vorhanden ist, drücken sich rezessive Gene auf diesem Chromosom immer aus. Hier werden zwei Kreuzungen gezeigt, die beide ein rezessives Gen (*w*, für weiße Augen) auf dem X-Chromosom betreffen.

lichkeit, daß 2 Gene desselben Chromosoms während der Meiose zusammen bleiben, variiert zwischen etwas weniger als 100% und ungefähr 50%.

Das bedeutet, daß es einen Mechanismus geben muß, der einen Austausch von Genen auf homologen Chromosomen ermöglicht. Diesen Mechanismus



(b)

In (a) ist der männliche Partner weißäugig ( $wY$ ) und die weibliche Fliege ist homozygot für rote Augen ( $WW$ ). In (b) hat das Männchen rote Augen ( $WY$ ) und das Weibchen weiße ( $ww$ ). Der Buchstabe ( $Y$ ) bezeichnet hier nicht ein Allel sondern das Y-Chromosom, das beim *Drosophila*-Männchen anstelle eines homologen X-Chromosoms vorliegt. Auf dem Y-Chromosom gibt es kein Gen, das dem ( $w$ ) oder ( $W$ )-Gen auf dem X-Chromosom entspricht.

nennt man Crossing-over. Seine zytologischen Grundlagen wurden von dem belgischen Zytologen Janssens zum ersten Mal beschrieben. Zu Beginn der Meiose bilden die homologen Chromosomen Paare (Synapsen), wobei ihre Längsachsen parallel ausgerichtet sind. Zu diesem Zeitpunkt hat sich jedes



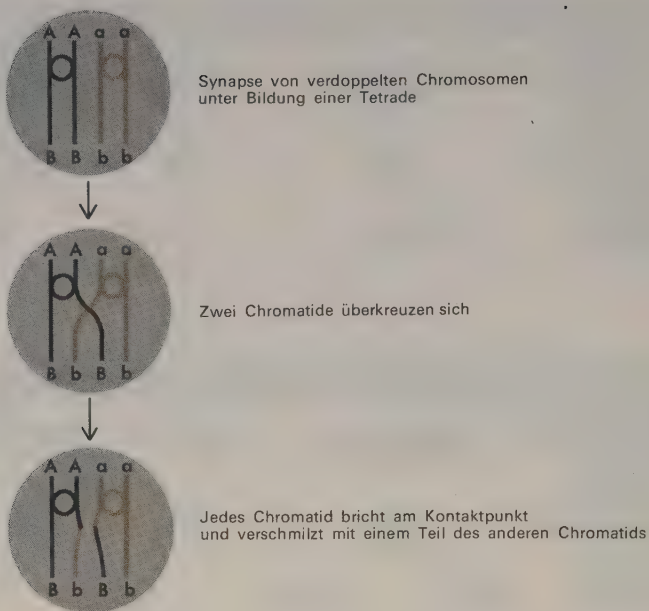


ABBILDUNG 1-12 Janssens' Theorie über das Crossing-over.

Chromosom bereits verdoppelt und besteht nun aus zwei Chromatiden. Die Synapse bringt also 4 Chromatide (eine Tetrade) zusammen, welche sich umeinander winden. Janssens postulierte, daß möglicherweise infolge der Spannung, die aus der Verwindung resultiert, 2 der Chromatide manchmal an korrespondierenden Stellen brechen können. Dadurch würden 4 Bruchstellen entstehen, die sich kreuzweise vereinigen können, sodaß ein Teil jedes der beiden Chromatide mit einem des anderen Chromatids verknüpft werden würde (Abbildung 1-12). Es könnten auf diese Weise Rekombinanten-Chromatide gebildet werden, die einen Teil von jedem der ursprünglichen Chromosomen tragen.

Morgan und seine Schüler nützten sofort die in der unbewiesenen Janssens'schen Theorie enthaltenen Folgerungen aus: daß nämlich Gene, die auf einem Chromosom nahe beieinander liegen, viel häufiger miteinander auftreten werden (enge Kopplung) als Gene, die weit voneinander entfernt auf einem Chromosom sitzen. Man hat damit die Möglichkeit, die relative Position der Gene auf den verschiedenen Chromosomen zu bestimmen, zu kartieren (wegen näherer Details siehe Kapitel 7). Mehr als 85 Mutantengenen von *Drosophila* war bis 1915 ein bestimmter Platz zugewiesen worden,

wobei jedes Gen einem bestimmten Punkt auf einer der 4 Kopplungsgruppen oder Chromosomen entspricht (Tabelle 1-1). Die endgültige Zusammenfassung, die Morgan dann veröffentlichte 'The Mechanism of Mendelian Heredity' zeigte die allgemeine Gültigkeit der chromosomalen Grundlage der Vererbung. Dieses Konzept steht der Evolutionstheorie und der Zelltheorie als eine der wichtigsten Errungenschaften der Biologen auf ihrem Weg, das Wesen des Lebens zu verstehen, ebenbürtig zur Seite.

**TABELLE 1-1.** Die fünfundachtzig Mutantengene, die bis 1915 in *Drosophila Melanogaster* beschrieben wurden.

*Gruppe I*

<i>Name</i>	<i>Betroffene Region</i>	<i>Name</i>	<i>Betroffene Region</i>
Abnormal	Unterleib	Lethal, 13	Körper, letal
Bar	Auge	Miniature	Flügel
Bifid	Venenanordnung	Notch	Venenanordnung
Bow	Flügel	Reduplicated	Augenfarbe
Cherry	Augenfarbe	Ruby	Bein
Chrome	Körperfarbe	Rudimentary	Flügel
Cleft	Venenanordnung	Sable	Körperfarbe
Club	Flügel	Shifted	Venenanordnung
Depressed	Flügel	Short	Flügel
Dotted	Thorax	Skee	Flügel
Eosin	Augenfarbe	Spoon	Flügel
Facet	Augenstruktur	Spot	Körperfarbe
Forked	Rückgrat	Tan	Antenne
Furrowed	Auge	Truncate	Flügel
Fused	Venenanordnung	Vermillion	Augenfarbe
Green	Körperfarbe	White	Augenfarbe
Jaunty	Flügel	Yellow	Körperfarbe
Lemon	Körperfarbe		

*Gruppe II*

Antlered	Flügel	Jaunty	Flügel
Apterous	Flügel	Limited	Unterleibsband
Arc	Flügel	Little Crossover	II Chromosom
Balloon	Venenanordnung	Morula	Augenstruktur
Black	Körperfarbe	Olive	Körperfarbe
Blistered	Flügel	Plexus	Venenanordnung
Comma	Thorax-Mal	Purple	Augenfarbe
Confluent	Venenanordnung	Speck	Thorax-Mal
Cream II	Augenfarbe	Strap	Flügel
Curved	Flügel	Streak	Muster
Dachs	Bein	Trefoil	Muster
Extra vein	Venenanordnung	Truncate	Flügel
Fringed	Flügel	Vestigial	Flügel

*Gruppe III*

<i>Name</i>	<i>Betroffene Region</i>	<i>Name</i>	<i>Betroffene Region</i>
Band	Muster	Pink	Augenfarbe
Beaded	Flügel	Rough	Auge
Cream III	Augenfarbe	Safranin	Augenfarbe
Deformed	Auge	Sepia	Augenfarbe
Dwarf	Körpergröße	Sooty	Körperfarbe
Ebony	Körperfarbe	Spineless	Rückgrat
Giant	Körpergröße	Spread	Flügel
Kidney	Auge	Trident	Muster
Low crossing-over	III Chromosom	Truncate intens.	Flügel
Marron	Augenfarbe	Whitehead	Muster
Peach	Augenfarbe	White ocelli	Einfaches Auge

*Gruppe IV*

Bent	Flügel		Eyeless	Auge
------	--------	--	---------	------

\* Die Mutationen fallen in vier Kopplungsgruppen. Da zytologisch vier Chromosomen beobachtet wurden, deutete das an, daß die Gene auf Chromosomen angeordnet sind. Man merke, daß Mutationen in mehreren Genen einzelne Merkmale auf verschiedene Weise beeinflussen können.

**MEHRERE GENE KONTROLLIEREN DIE AUGENFARBE**

Eine bloße Betrachtung der Liste von Mutantengenen in Tabelle 1-1 zeigt eine wichtige Tatsache: viele verschiedene Gene können ein einziges Merkmal beeinflussen. So betreffen 13 aller bis 1915 bekannten Gene die Augenfarbe. Wenn eine Fliege in Bezug auf eine der Mutantenformen irgendeines dieser Gene homozygot ist, ist die Augenfarbe nicht rot sondern von verschiedener, für das Gen charakteristischer Farbe (z.B. blaßrot, zinnober). Es gibt also keine 1:1 Beziehung zwischen Genen und komplexen Merkmalen wie Augenfarbe oder Flügelform. Die Entwicklung jedes Merkmals wird von einer Zahl von Einzelereignissen bestimmt, von welchen jedes durch ein Gen kontrolliert wird. Man könnte einen bildhaften Vergleich mit der Funktionsweise einer komplizierten Maschine, z.B. des Autos, anstellen: Es gibt eine Anzahl verschiedener Teile wie Motor, Bremsen, Kühler und Benzintank, die alle für den ordnungsgemäßen Betrieb notwendig sind. Obwohl ein Fehler in einem der Teile ausreichen kann, um den normalen Betrieb des Autos zu stören, darf man nicht annehmen, daß dieser Teil alleine genügt, um ein ordentliches Funktionieren zu gewährleisten.



## URSPRUNG DER GENETISCHEN VARIABILITÄT DURCH MUTATIONEN

Es war nun möglich, die Variabilität im Erbgut, die man in der ganzen biologischen Welt antrifft und die die Grundlage der Evolutionstheorie darstellt, zu verstehen. Normalerweise werden Gene während der Verdoppelung der Chromosomen genau kopiert. In seltenen Fällen kann es jedoch zu Veränderungen der Gene (Mutationen) kommen, welche zu veränderten Formen führen, die im allgemeinen, aber nicht immer, ungünstiger als die Wildtyp Allele sind. Dieser Vorgang ist natürlich selten, sonst würden ja während jedes Zellzyklus viele Gene verändert und die Nachkommenschaft wäre im allgemeinen den Eltern nicht mehr ähnlich. Eine kleine, aber begrenzte Mutationshäufigkeit bringt hingegen einen großen Vorteil mit sich. Sie stellt eine ständige Quelle neuer Variabilität dar, die notwendig ist, um Pflanzen oder Tieren eine Anpassungsmöglichkeit an die stetig wechselnde physikalische und biologische Umwelt zu geben. Überraschenderweise wurden die Resultate der Mendelschen Genetiker von den klassischen Biologen, die damals die Autoritäten für die entwicklungsgeschichtlichen Beziehungen zwischen den verschiedenen Formen des Lebens waren, nicht sofort begierig aufgegriffen. Zweifel wurden erhoben, ob genetische Veränderungen der Art, wie sie Morgan und seine Schüler untersuchten, für die Entwicklung völlig neuer Strukturen wie Augen und Flügel ausreichten. Man glaubte statt dessen, daß es auch durchgreifendere Veränderungen, «Makromutationen», geben müßte, und daß diese die großen Fortschritte in der Evolution ermöglichen.

Langsam verschwanden aber doch die Zweifel, hauptsächlich dank der Bemühungen der mathematisch orientierten Genetiker Wright, Fisher und Haldane. Sie konnten zeigen, daß in Anbetracht des hohen Alters der Erde auch die relativ geringe Mutationshäufigkeit, die man bei *Drosophila* gefunden hatte, zusammen mit wenn auch nur kleinen, selektiven Vorteilen, genügen würde, um zu einer langsamen Anhäufung neuer, günstiger Eigenschaften zu führen. Um 1930 begannen dann auch die Biologen ihre Vorstellungen über den Ursprung der Arten aufs Neue zu betrachten und die Arbeiten der mathematisch orientierten Genetiker zu verstehen. Zu diesen Neu-Darwinisten gehörten u.a. auch der Biologe Julian Huxley (ein Enkel des ursprünglichen Verfechters der Darwin'schen Theorie, T. H. Huxley), der Genetiker Dobzhansky, der Paleontologe Simpson und der Ornithologe Mayr. In den 40er Jahren veröffentlichten alle vier bedeutende Arbeiten, in denen jeder von seinem Standpunkt aus zeigte, daß die Mendelschen Gesetze mit dem Darwinismus tatsächlich in Einklang zu bringen waren.

## FRÜHE SPEKULATIONEN ÜBER DIE NATUR DER GENE UND IHRE WIRKUNGSWEISE

Fast unmittelbar nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Gesetze begannen die Genetiker Spekulationen über die chemische Struktur und die Wirkungsweise der Gene anzustellen. Ein wirklicher Fortschritt war jedoch unmöglich, da die chemische Natur des genetischen Materials noch unbekannt war. Sogar die Erkenntnis, daß Nukleinsäuren und Proteine in den Chromosomen vorhanden waren, half nicht weiter, da die Struktur dieser beiden Verbindungsklassen völlig unverstanden war.

Die fruchtbarsten Spekulationen gingen davon aus, daß Gene in irgendeiner Weise zur Selbstduplikation fähig sein mußten. Jedes Mal, wenn aus einem Chromosom zwei werden, muß die Struktur genau kopiert werden. Diese Tatsache führte unmittelbar zu der grundlegenden chemischen Frage, wie ein kompliziertes Molekül so genau kopiert werden kann, daß es zu einem völlig gleichen Gegenstück führt.

Das Gen erregte auch die Neugier einiger Physiker. Mit der Einführung der Quantenmechanik in den späten 20er Jahren, tauchte plötzlich die Möglichkeit auf, daß es vielleicht für das Verständnis des Gens notwendig sein werde, die letzten Feinheiten der theoretischen Physik zu beherrschen. Diese Gedanken hatten jedoch keine großen Folgen, da es auch für den besten Physiker oder theoretischen Chemiker völlig offensichtlich war, daß sie sich nicht mit Substanzen beschäftigen konnten, deren Struktur noch ungeklärt war. Es gab nur ein etabliertes Faktum über das man nachdenken konnte: Müller hatte 1927 entdeckt, daß Röntgenstrahlen zu Mutationen führen. Da Röntgenstrahlen ein großes Gen mit größerer Wahrscheinlichkeit als ein kleines treffen, kann man aus der Häufigkeit von Mutationen, die von einer bestimmten Dosis von Röntgenstrahlen in einem bestimmten Gen hervorgerufen werden, auf die Größe dieses Gens rückschließen. Aber auch hier mußte man so viele spezielle Annahmen machen, daß praktisch niemand, nicht einmal die Autoren dieser Schätzungen, sie wirklich sehr ernst nahmen.

## FRÜHE VERSUCHE, EINE BEZIEHUNG ZWISCHEN GENEN UND PROTEINEN ZU FINDEN

Die vielversprechendsten Bemühungen, Beziehungen zwischen Genen und Proteinen zu finden, beschäftigten sich mit der Art und Weise, auf die Veränderungen von Genen die in einer Zelle enthaltenen Proteine beeinflussen. Diese Untersuchungen waren anfänglich schwierig, da niemand über die Proteine, die in Strukturen wie Auge und Flügel auftreten, wirklich Bescheid wußte. Es stellte sich bald heraus, daß Gene, die einfache Stoffwech-

sel-Funktionen kontrollierten, leichter zu untersuchen waren als solche, die größere Merkmale beeinflussen. Eines der ersten brauchbaren Beispiele ergab sich aus der Untersuchung einer Erbkrankheit, die den Aminosäure-Stoffwechsel beeinflusst. Es gibt spontane Mutationen beim Menschen, die die Fähigkeit, die Aminosäure Phenylalanin zu metabolisieren, beeinträchtigen. Wenn Menschen, die für diese veränderte Eigenschaft homozygot sind, Phenylalanin mit der Nahrung aufnehmen, führt ihre Unfähigkeit, diese Verbindung in Tyrosin umzuwandeln, zu einer toxischen Menge von Phenylbrenztraubensäure im Blut.

Die Existenz solcher Krankheiten, ein Beispiel für die angeborenen Stoffwechselfehler, brachte den Physiker Garrod schon 1909 auf die Idee, daß das Wildtyp-Gen für das Vorkommen eines bestimmten Enzyms verantwortlich sein könnte und daß bei einer homozygoten Mutante dieses Enzym von Geburt aus fehlt.

Garrods allgemeine Hypothese über eine Gen-Enzym Beziehung wurde in den 30er Jahren durch Arbeiten über Blumenfarbstoffe und Pigmente der Insektenaugen erweitert. In beiden Fällen fand man Beweise dafür, daß ein bestimmtes Gen einen bestimmten Schritt der Pigmentbildung beeinflusst. Da man aber keine grundlegenden Kenntnisse der Struktur der betreffenden Proteine hatte, waren genauere Untersuchungen der Gen-Protein Beziehungen unmöglich und man konnte weder mit Sicherheit behaupten, daß die meisten Gene die Synthese eines Proteins kontrollieren (man vermutete damals schon, daß alle Enzyme Proteine wären) noch, daß alle Proteine unter genetischer Kontrolle stehen.

Schon um 1935 wurde es Genetikern der Mendelschen Schule klar, daß künftige Experimente der Art, wie sie zur Aufklärung der Grundlagen der Mendelschen Genetik geführt hatten, wahrscheinlich keine fruchtbaren Hinweise auf die Wirkungsweise der Gene liefern würden. Sie erkannten, daß es statt dessen notwendig sein würde, biologische Systeme zu finden, die chemischen Analysen zugänglich wären. Sie waren sich allerdings darüber im Klaren, daß der damalige Stand der Nukleinsäure- und Proteinchemie für eine chemische Analyse sogar der geeignetsten biologischen Systeme völlig ungeeignet war. Glücklicherweise hielten sie die Grenzen der Chemie nicht davon ab, genetische Experimente mit chemisch einfachen Pilzen, Bakterien und Viren zu entwickeln. Wir werden sehen, daß die notwendigen chemischen Grundlagen fast genau zu dem Zeitpunkt bekannt wurden, als die Genetiker soweit waren, sie anzuwenden.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung lebender Organismen auf biologischer Grundlage führte zu drei wichtigen Regeln: 1) Darwins und Wallaces Theorie der Evolution aufgrund der natürlichen Selektion, welche besagt, daß die komplexen Pflanzen und Tiere unserer Zeit durch fortschreitende ständige Evolution aus dem ersten, primitiven Organismus entstanden sind; 2) die Zelltheorie, also die Erkenntnis, daß alle lebenden Organismen aus Zellen aufgebaut sind und 3) die chromosomale Theorie der Vererbung, die erkannte, daß die Aufgabe der Chromosomen in der Kontrolle der Vererbung liegt.

Alle Zellen enthalten Chromosomen, die normalerweise vor einem Zellteilungsvorgang (Mitose), der zu zwei Tochterzellen führt, verdoppelt werden, wobei jede Tochterzelle die gleiche Chromosomenzahl wie die Mutterzelle enthält. In haploiden Zellen findet man nur ein Exemplar jeder Chromosomenart; in diploiden Zellen gibt es gewöhnlich zwei Kopien (Paare homologer Chromosomen). Eine diploide Zelle entsteht durch die Verschmelzung einer männlichen und einer weiblichen haploiden Zelle (Befruchtung), wogegen haploide Zellen aus diploiden Zellen auf dem Weg einer ganz bestimmten Art von Zellteilung (Meiose) entstehen, bei welcher die Chromosomenzahl auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes reduziert wird.

Chromosomen kontrollieren die Vererbung, weil sie die zellulären Träger von Genen sind. Die Gene wurden zuerst von Mendel 1865 entdeckt, aber ihre Bedeutung wurde erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannt. Jedes Gen kann in einer Anzahl verschiedener Formen auftreten, den Allelen. Nach Mendel wird ein Gen für jedes Erbmerkmal von jedem Elternteil an jeden Nachkommen weitergegeben. Die Ursache dafür liegt in der Verteilung der Chromosomen während der Meiose: Ein beliebiges der beiden homologen Chromosomen in jedem Chromosomenpaar wird jeweils auf eine haploide Zelle verteilt. Wenn zwei Gene auf demselben Chromosom liegen, neigen sie dazu, gemeinsam vererbt zu werden (gekoppelte Gene). Gene, die verschiedene Eigenschaften vererben, werden manchmal unabhängig voneinander vererbt. Der Grund dafür liegt darin, daß sie auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Auf alle Fälle ist die Kopplung selten absolut, da homologe Chromosomen sich während der Meiose oft aneinanderlagern, an identischen Stellen brechen und sich kreuzweise wieder vereinigen (Crossing-over). Auf diese Art werden Gene, die ursprünglich auf einem väterlichen Chromosom saßen mit Gengruppen eines mütterlichen Chromosoms verknüpft.

Verschiedene Allele eines Gens entstehen durch vererbhbare Veränderungen (Mutationen) dieses Gens. Normalerweise sind Gene sehr stabil und werden während der Chromosomenverdoppelung genau kopiert. Mutationen treten nur selten auf und sind gewöhnlich von Nachteil.

Sie spielen aber auch eine positive Rolle, da die Ansammlung der seltenen,



günstigen Mutationen die Ausgangsbasis für die genetische Variabilität darstellt, die in der Evolutionstheorie vorausgesetzt wird.

Viele Jahre hindurch blieben die Struktur der Gene und die chemischen Vorgänge, durch die sie die Eigenschaften der Zelle kontrollieren, völlig im Dunkeln. Als jedoch eine größere Zahl spontaner Mutationen beschrieben worden war, wurde offensichtlich, daß nicht einfach ein Gen ein Merkmal bestimmt, sondern daß alle komplexen Eigenschaften unter der Kontrolle vieler Gene stehen. Die einsichtigste Vorstellung, die von Garrod schon 1909 klar formuliert wurde, besagte, daß Gene die Synthese von Enzymen beeinflussen. Im allgemeinen waren aber die Systeme der Mendelschen Genetiker, Organismen, wie Mais, Maus und sogar die Fruchtfliege *Drosophila*, für chemische Untersuchungen der Gen-Protein-Beziehung nicht geeignet. Für diese Art von Untersuchungen war es unumgänglich notwendig, mit den wesentlich einfacheren Mikroorganismen zu arbeiten.

## LITERATUR

- Swanson, D. P., *The Cell*, 2. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964. Eine einführende Übersicht über die Zelltheorie.
- Moore, J. A., *Heredity and Development*, Oxford, New York, 1963. Eine elegante Einführung in die Genetik und Embryologie unter Betonung der historischen Entwicklung.
- Sturtevant, A. H., und G. W. Beadle, *An Introduction to Genetics*, Dover, New York, 1962. Dieses Buch, das 1939 zum ersten Mal erschien, gibt eine Übersicht über die *Drosophila*-Genetik von bleibendem Wert. Auch als Taschenbuch.
- Levine, R. P., *Genetics*, 2. Aufl., Holt, New York, 1968. Eine kurze Übersicht über die Genetik, die vor allem die Verwendung von Mikroorganismen beim Etablieren der chemischen Grundlagen der Genetik betont.
- Srb, A., R. Owen und R. Edgar, *General Genetics*, 2. Aufl., Freeman, San Francisco, 1965. Eine ausgezeichnete Einführung in die Genetik.
- Peters, J. A., *Classic Papers in Genetics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1959. Eine Sammlung von Sonderdrucken der meisten Arbeiten, die für die Entwicklung der Genetik von besonderer Bedeutung waren, bis zu Benzer's genauer Strukturanalyse des Gens.
- Carlson, E. J., *The Gene Theory: A Critical History*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1966. Gibt einen Überblick über die Entwicklung der Genetik von Mendel bis zur Gegenwart.
- Mayr, E., *Animal Species and Evolution*, Harvard University Press, Cambridge, 1963. Eine vollständige Liste der Fakten, die die Evolutionstheorie unterstützen.

# 2

## ZELLEN GEHORCHEN DEN GESETZEN DER CHEMIE

Schon zu Zeiten Darwins fragten sich die Chemiker, ob lebende Zellen denselben Regeln gehorchten wie leblose Systeme. Es war damals schon bekannt, daß Zellen keine Atome enthalten, die nur für lebende Materie charakteristisch wären. Man erkannte auch früh die vorherrschende Rolle des Kohlenstoffs, der ein Hauptbestandteil fast aller Arten biologischer Verbindungen ist. Die ursprüngliche Tendenz zwischen Verbindungen des Kohlenstoffs, wie man sie bei der lebenden Materie kennt, und allen anderen Molekülen zu unterscheiden, spiegelt sich noch in der Trennung der modernen Chemie in eine organische (dem Studium der meisten kohlenstoffhaltigen Verbindungen) und eine anorganische Chemie wider. Wir wissen heute, daß diese Unterscheidung künstlich ist und jeder biologischen Grundlage entbehrt. Es gibt keine rein chemische Methode zu unterscheiden, ob eine Verbindung in einer Zelle oder in einem chemischen Laboratorium synthetisiert wurde.

Trotzdem hatte man während des ersten Viertels dieses Jahrhunderts in vielen chemischen und biologischen Laboratorien das ausgeprägte Gefühl, daß irgendeine vitale Kraft außer den Gesetzen der Chemie den Unterschied zwischen belebter und unbelebter Materie ausmache. Die Ursache dafür, daß dieser «Vitalismus» überdauerte, lag teilweise darin, daß der Erfolg der biologisch orientierten Chemiker (heute gewöhnlich als Biochemiker bezeichnet) begrenzt war. Obwohl die Methoden der organischen Chemiker ausreichten, um die Struktur relativ

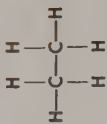
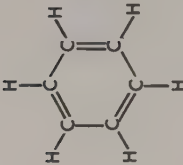
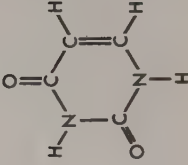
kleiner Verbindungen, wie der Glucose (Tabelle 2-1) aufzuklären, wurde man sich mehr und mehr darüber klar daß viele der wichtigsten Moleküle einer Zelle sehr groß waren, sogenannte Makromoleküle, zu groß, um selbst von den besten organischen Chemikern untersucht zu werden.

Lange Zeit hindurch wurden die Proteine für die wichtigste Makromolekülgruppe gehalten, da man immer mehr Beweise dafür fand, daß alle Enzyme Proteine sind. Ursprünglich herrschte Uneinigkeit darüber, ob Enzyme kleine Moleküle oder Makromoleküle wären. Erst 1926 wies der amerikanische Biochemiker Sumner den Enzymcharakter eines kristallisierten Proteins nach; der Streit war damit praktisch beigelegt. Aber selbst diese bedeutende Entdeckung konnte die Aura des Geheimnisvollen, die die Proteine umgab, nicht durchdringen. Die komplexen chemischen Strukturen der Proteine konnten zu dieser Zeit mit den vorhandenen chemischen Methoden nicht aufgeklärt werden. Es war daher möglich, daß noch 1940 manche Wissenschaftler glaubten, daß diese Moleküle letzten Endes doch Eigenschaften zeigen würden, die nur für lebende Systeme charakteristisch wären.

Man glaubte auch allgemein, daß die Gene, wie die Enzyme, Proteine sein könnten. Es gab keine direkten Beweise dafür, aber der hohe Grad von Spezifität, den die Gene zeigten, ließ viele Leute, die sich Vorstellungen über ihre Natur machten, vermuten, daß sie nur Proteine sein könnten, von denen man wußte, daß sie in den Chromosomen vorkamen. Noch eine andere Verbindungsklasse, die Nukleinsäuren, wurde als normaler Chromosomenbestandteil erkannt, aber man hielt sie für relativ kleine Moleküle und für nicht fähig, eine ausreichend genetische Information zu enthalten.

Neben der allgemeinen Unkenntnis über die Natur von Makromolekülen wurde oft dem Gefühl Ausdruck verliehen, daß irgend etwas Besonderes in der 3-dimensionalen Organisation der Zelle ihr ihre Eigenschaften als lebende Einheit verlieh. Diese Ansicht wurde oft als Unmöglichkeit, je die genauen chemischen Wechselwirkungen der Zelle zu verstehen, ausgedrückt. Häufiger wurde sie jedoch als die Voraussage formuliert, daß neue Naturgesetze, gleichbedeutend der Zell- oder der Evolutionstheorie gefunden werden müßten, bevor man das Wesen des Lebens verstehen können würde. Diese fast mystischen Ideen führten jedoch nie zu sinnvollen Versuchen und konnten in ihrer allgemein gehaltenen Form nie überprüft werden. Fortschritte wurden unterdessen nur von den biologisch orientierten Chemikern und Physikern gemacht, die geduldig versuchten, neue Wege zur Aufklärung immer komplizierterer biologischer Strukturen zu beschreiten. Viele Jahre hindurch konnte man keine Triumphe verkünden. Chemiker und Biologen lebten in verschiedenen, oft feindlichen Welten, wobei die Biologen oft die Möglichkeit bestritten, daß die Chemiker je die wahre Lösung der bedeutsamen Rätsel der Biologie finden würden. In den Vorstellungen mancher Biologen lebte — nicht allzutief verborgen — das Gefühl, wenn nicht die Hoffnung, daß

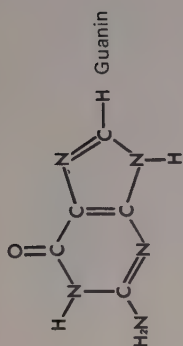
TABELLE 2-1. Einige wichtigen Vertreter kleiner biologischer Moleküle

Klasse	Eigenschaften	Beispiel
Aliphatische Kohlenwasserstoffe	Geradkettige oder verzweigte Moleküle, die nur Kohlenstoff und Wasserstoff enthalten	 Äthan
Aromatische Kohlenwasserstoffe	Zyklische Kohlenwasserstoffe, die abwechselnd Einfach- und Doppelbindungen enthalten	 Benzol
Pyrimidin	Aromatische Verbindung mit der Summenformel $C_4H_4N_2$ oder eines ihrer Derivate	 Uracil



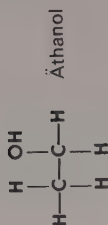
Purin

Aromatische Verbindung der Summenformel  $C_5H_4N_4$  (oder ein Derivat)



Alkohol

Kohlenwasserstoff-Skelett, mit einer oder mehreren OH-Gruppen substituiert



Phosphatester

Moleküle, die sich aus Alkoholen und Phosphorsäuren unter Abspaltung von  $H_2O$  bilden

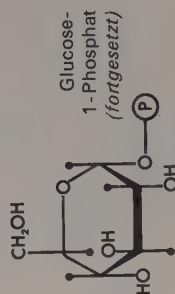
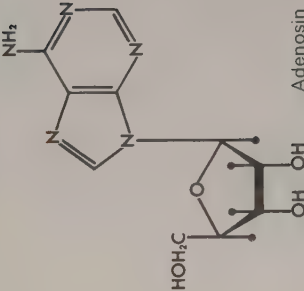
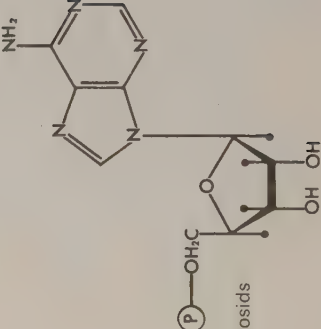


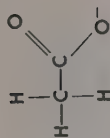
TABELLE 2-1. (fortgesetzt)

Klasse	Eigenschaften	Beispiel
Nukleosid	Enthält einen Pentosezucker, der über eine C-N-Bindung an eine Purin- oder Pyrimidinbase gebunden ist	 <p>Adenosin</p>
Nukleotid	Phosphatester eines Nukleosids	 <p>Phosphatester eines Nukleosids</p> <p>Adenosin-5- oder Adenyl- säure</p>

Carbonsäuren

Kohlenwasserstoff-Skelett mit einer oder mehreren COO<sup>-</sup>-Gruppen

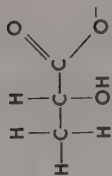
Acetat



Hydroxy-Säuren

Substituierte Kohlenwasserstoffe, die sowohl OH- als COO<sup>-</sup>-Gruppen enthalten

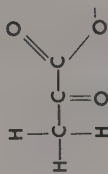
Lactat



Ketosäuren

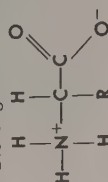
Substituierte Kohlenwasserstoffe, die sowohl Keto- als auch COO<sup>-</sup>-Gruppen enthalten

Pyruvat



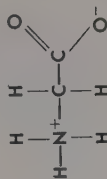
Aminosäuren

Enthalten sowohl NH<sub>2</sub>- als auch COO<sup>-</sup>-Gruppen; beide Gruppen sind im allgemeinen geladen. Die allgemeine Formel ist



wobei (R) eine Gruppe darstellt, die von AS zu AS variiert. Es gibt 20AS, jede mit einer distinkten (R)-Gruppe

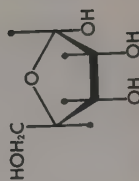
Glycin



Zucker (Monosaccharide)

Polyhydroxyverbindungen, die C=O Gruppen enthalten (Aldehyde oder Ketone). Die häufigsten Zucker haben 3 (Triose), 4 (Tetrose), 5 (Pentose) oder 6 (Hexose) Kohlenstoffatome

Ribose



etwas Grundlegenderes als nur Komplexität und Größe die Biologie von der farblosen, unbelebten Welt eines chemischen Laboratoriums trennte.

## DER BEGRIFF DES INTERMEDIÄRSTOFFWECHSELS

Sobald die organischen Chemiker einige der vielen verschiedenen Verbindungen einer Zelle analysiert hatten, wurde klar, daß die mit der Nahrung aufgenommenen Moleküle nach Eintritt in den Körper durchgreifend verändert werden. Die Nahrungsquelle enthält niemals alle die verschiedenen Verbindungen, die in einer Zelle auftreten. Ganz im Gegenteil, in vielen Fällen werden sogar praktisch alle organischen Verbindungen des Organismus in diesem selbst erzeugt. Man kann sich das leicht veranschaulichen, wenn man das Zellwachstum in definierten Nährmedien beobachtet, z.B. das Wachstum von Hefezellen unter Verwendung des einfachen Zuckers Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. In diesem Fall wird die Glucose bald nach dem Eintritt in die Zelle auf chemischem Weg in eine Vielzahl von Verbindungen umgewandelt, die für den Aufbau neuer Strukturkomponenten notwendig sind. Im allgemeinen sind diese chemischen Umwandlungen nicht einstufig, sondern es werden Zwischenprodukte synthetisiert. Diese intermediär auftretenden Verbindungen haben oft keine andere Funktion in der Zelle als die, ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur Synthese einer notwendigen Zellkomponente, wie z.B. einer Aminosäure, darzustellen.

Die Summe aller chemischen Reaktionen, die in einer Zelle ablaufen, wird häufig als *Stoffwechsel (Metabolismus)* der Zelle bezeichnet. Entsprechend nennt man die verschiedenen Verbindungen, die an diesen Umwandlungen beteiligt sind, oft *Stoffwechselprodukte (Metaboliten)*. Der Ausdruck *Intermediärstoffwechsel* wird zur Beschreibung der verschiedenen chemischen Reaktionen verwendet, die an der Umwandlung von Molekülen aus der Nahrung in essentielle Zellbausteine beteiligt sind.

## ENERGIEERZEUGUNG DURCH OXYDATIONS-REDUKTIONS-VORGÄNGE

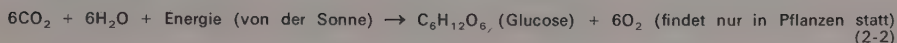
Es war schon um die Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt, daß die Nahrung (ursprünglich pflanzlichen Ursprungs), die Tiere und Bakterien zu sich nehmen, nur teilweise in neue Zellbausteine umgewandelt wird; ein Teil wird unter Sauerstoffaufnahme zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und Energie verbrannt. Zur gleichen Zeit wurde auch klar, daß der umgekehrte Vorgang ebenfalls, und zwar in grünen Pflanzen, stattfindet.

Atmung:





### Photosynthese:



Beide Ausdrücke können als Gesamtsumme einer langen Reihe von Oxydations-Reduktions-Reaktionen angesehen werden.

Bei der Atmung werden organische Verbindungen wie z.B. Glucose durch molekularen Sauerstoff unter Bildung von C=O-Gruppen (Tabelle 2-2) oxydiert, die *weniger* verwertbare Energie (Energie, die in Arbeit umgewandelt werden kann) enthalten als die ursprünglichen C-H, C-OH und C-C-Bindungen. Bei der Atmung wird Energie abgegeben, genau wie bei der Verbrennung von Glucose außerhalb der Zelle bei hohen Temperaturen, wenn  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und Wärmeenergie erzeugt werden. Im Gegensatz dazu wird bei der Photosynthese die Energie der Lichtquanten von der Sonne zur Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Verbindungen, die *mehr* verwertbare Energie enthalten, verwendet.

Als diese Vorgänge zum ersten Mal aufgeklärt wurden, wußte niemand, wie die Energie, die bei der Atmung freigesetzt wird, vorteilhaft ausgenutzt werden kann. Es war klar, daß dem lebenden Organismus eine brauchbare Form von Energie zur Verfügung stehen mußte, um es ihm zu ermöglichen, verschiedene Arbeiten wie z.B. Muskelkontraktion und den selektiven Transport von Molekülen durch Zellmembranen zu verrichten. Schon damals schien es unwahrscheinlich, daß die Energie aus der Nahrung zuerst als Wärme freigesetzt werde, da bei den Temperaturen, bei denen Leben existieren kann, die Wärmeenergie nicht effektiv zur Knüpfung neuer chemischer Bindungen herangezogen werden kann.

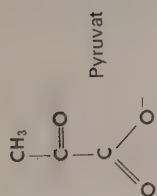
Seit das Interesse an der Chemie des Lebens erwachte, galten daher besondere Bemühungen dem Verständnis, wie Energie in einer verwertbaren Form erzeugt werden könnte.

### DIE MEISTEN BIOLOGISCHEN OXYDATIONEN GEHEN OHNE DIREKTE BETEILIGUNG VON SAUERSTOFF VOR SICH

Da Sauerstoff für das Leben der Tiere so unbedingt notwendig ist, war es naheliegend anzunehmen, daß er an allen Oxydationen von Kohlenstoffverbindungen direkt beteiligt wäre. Tatsächlich finden jedoch fast alle biologischen Oxydationen in Abwesenheit von Sauerstoff statt. Das ist deshalb möglich, weil fast alle biologischen Oxydationen eigentlich Dehydrierungen sind, wie der deutsche Biochemiker Wieland zum ersten Mal 1912 vorschlug. Eine Verbindung wird oxydiert, wenn man 2 Wasserstoffatome entfernt (Abbildung 2-1). Es ist aber nicht möglich, die beiden Wasserstoffatome

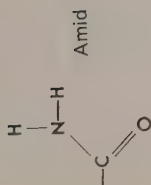
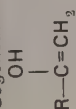
TABELLE 2-2. Wichtige funktionelle Gruppen in biologischen Molekülen

Gruppe	Beispiel	Biologische Bedeutung
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$ Methyl	$\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} \\   &   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{N}^+-\text{H} \\    &   \\ \text{O} & \text{H} \\   \\ \text{O}^- \end{array}$ Methylgruppe in Alanin	Höchst wasserunlöslich; bildet keine Wasserstoff-Brückenbindungen
—OH Hydroxyl	$\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} \\   &   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\   &   \\ \text{H} & \text{H} \end{array}$ Ätanol (Äthylalkohol)	Wasserlöslich; bildet Wasserstoff-Brückenbindungen
$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ Carboxyl	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$ Essigsäure	Häufig geladen; guter Akzeptor von Wasserstoff-Brückenbindungen
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{N}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$ Amino	$\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\    &    \\ \text{H}-\text{C}-\text{N}^+-\text{H} & \text{H}-\text{C}-\text{O}^- \\    &   \\ \text{O} & \text{OH} \end{array}$ Glycin	Häufig geladen; bildet Wasserstoff-Brückenbindungen
$\begin{array}{c} \text{C}=\text{O} \\   \end{array}$ Carbonyl	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{H} \end{array}$ Acetaldehyd	Bildet Wasserstoff-Brückenbindung vor $\text{R}-\text{C}-\text{CH}_3$ $\text{O}$ kommt meist in der Ketoform

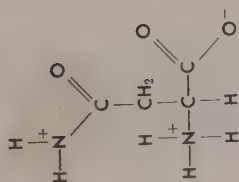


Pyruvat

Im Gegensatz zur Enolform

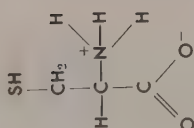


Amid



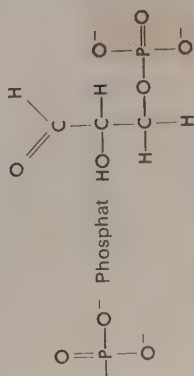
Asparagin

Bildet Wasserstoff-Brückenbindungen; sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe bilden starke Wasserstoff-Brückenbindungen



Cystein

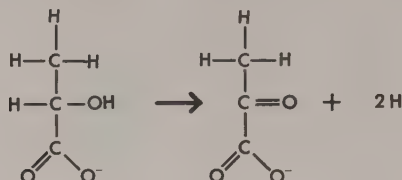
Zwei S-H-Gruppen werden leicht zu einer S-S-Gruppe oxidiert (Disulfid-Bindungen); SH-Gruppen bilden sehr schwache Wasserstoff-Brückenbindungen



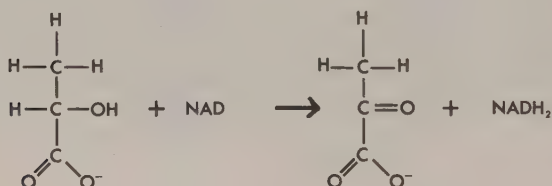
Glycerinaldehyd-3-phosphat

Immer negativ geladen; bildet Wasserstoff-Brückenbindungen mit Wasser und ist daher sehr gut wasserlöslich

einfach zu entfernen. Sie müssen auf ein anderes Molekül übertragen werden, welches dadurch reduziert wird (Abbildung 2-2). Bei dieser Reaktion, wie bei allen Oxydations-Reduktions-Vorgängen, muß jedes Mal, wenn ein



**ABBILDUNG 2-1** *Oxydation eines organischen Moleküls durch Entfernung zweier Wasserstoffatome. Die Abbildung zeigt die Oxydation von Milchsäure zu Brenztraubensäure.*



**ABBILDUNG 2-2** *Die Beteiligung von NAD an der Oxydation von Milchsäure zu Brenztraubensäure. Das Oxydationsmittel ist in diesem Fall NAD. Der Wasserstoffdonator ist Brenztraubensäure.*

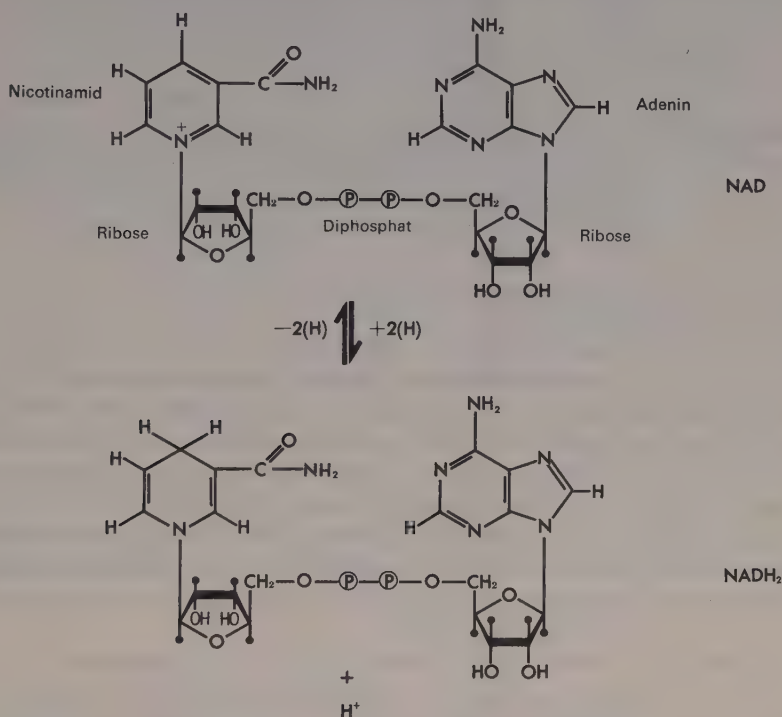
Molekül oxydiert wird, ein anderes reduziert werden. Es gibt verschiedene Moleküle, deren Aufgabe es ist, Wasserstoff aufzunehmen. Dabei handelt es sich um organische Verbindungen von mittlerem Molekulargewicht (ungefähr 500), die sich an spezifische Proteine binden und aktive Enzyme bilden.

Die Proteinkomponente allein hat keine enzymatische Aktivität. Diese ist erst vorhanden, wenn der niedrig molekulare Partner vorhanden ist. Man nennt diese kleinen Moleküle daher *Coenzyme* (nicht alle Coenzyme sind an Oxydations-Reduktions-Vorgängen beteiligt, andere wirken bei anderen Stoffwechselvorgängen).

Obwohl es schon um 1910 Hinweise für die Beteiligung von Coenzymen an Oxydationsvorgängen gab, wurde ihre eminente Bedeutung erst in den frühen 30er Jahren wirklich erkannt. Zu dieser Zeit wurden die Struktur und Wirkungsweise einiger der bedeutendsten Coenzyme von dem großen deutschen Biochemiker Otto Warburg und den schwedischen Chemikern von Euler und Theorell aufgeklärt: Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD,

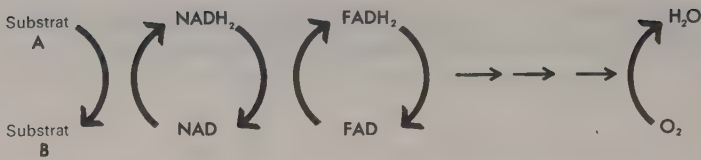


früher Diphosphopyridin-nukleotid, DPN, genannt, Abbildung 2-3), Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavin-adenin-dinukleotid (FAD).



**ABBILDUNG 2-3** Oxydation und Reduktion eines Coenzym. Hier werden sowohl die oxydierte als auch die reduzierte Form des äußerst wichtigen Coenzym Nicotinamid-adenin-dinukleotid NAD (oxydierte Form), ein Wasserstoffakzeptor, und  $\text{NADH}_2$  (reduzierte Form), ein Wasserstoffdonator, gezeigt. Abgabe von Wasserstoffatomen verringert die freie Energie eines Moleküls, Aufnahme erhöht sie.

Coenzyme können genauso wie Enzyme viele verschiedene Reaktionszyklen durchmachen und werden dabei nicht verbraucht. Der Grund dafür ist, daß die Wasserstoffatome, die auf sie übertragen werden, nicht ständig an sie gebunden bleiben, sondern durch eine neue Oxydations-Reduktions-Reaktion weitergegeben werden, meist an andere Coenzyme oder an Sauerstoff selbst. (Abbildung 2-4). Coenzyme werden also ständig oxydiert und reduziert. Außerdem sehen wir, daß Sauerstoff zwar für eine gegebene Reaktion nicht unmittelbar notwendig ist, aber indirekt doch gebraucht wird, da er zur Oxydation der Coenzyme herangezogen wird, um diese zur weiteren Aufnahme von zwei Wasserstoffatomen (oder Elektronen) zu befähigen.



**ABBILDUNG 2-4** Die Übertragung eines Paares von Wasserstoffatomen von einem Coenzym auf ein anderes. In dieser Reaktionsfolge ist der endgültige Wasserstoffakzeptor Sauerstoff ( $O_2$ ). FAD ist Flavin-adenin-dinukleotid, das nicht frei sondern im allgemeinen in Verbindung mit einem spezifischen Protein als Flavoprotein vorkommt.

## DER ABBAU DER GLUCOSE

Ein Großteil der frühen Arbeiten über den Intermediärstoffwechsel beschäftigte sich mit der Umwandlung der Glucose in andere Moleküle. Die Betonung von Glucose war nicht nur auf ihre zentrale Rolle im Zellhaushalt, sondern auch auf praktische Erwägungen: der Alkohol (Äthanol), der entsteht, wenn Wein aus Trauben gemacht wird, stammt aus dem Abbau der Glucose.

Schon 1810 hatte der Chemiker Gay-Lussac die Erzeugung von Äthylalkohol durch dieses Verfahren bewiesen und bis 1837 war die essentielle Rolle der Hefe bei diesem Prozeß eindeutig nachgewiesen. Die Bildung von Alkohol im Wein ist kein spontaner Vorgang, sondern erfordert normalerweise die Anwesenheit von lebenden Hefezellen.

An den frühen Arbeiten über Glucose war auch der französische Mikrobiologe Pasteur beteiligt, der nachwies, daß bei diesem Vorgang keine Luft benötigt wird; um diesen Prozeß von denen, die Sauerstoff verbrauchen, zu unterscheiden, verwendete er den Ausdruck Gärung. Er zeigte auch, daß Äthanol nicht das einzige Produkt der Glucosevergärung ist, sondern daß nebenbei andere Verbindungen wie z.B. Milchsäure und Glycerin entstehen.

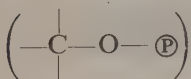
Der nächste große Fortschritt wurde 1897 mit Buchners Entdeckung gemacht, daß die lebende Zelle als solche für die Gärung nicht notwendig ist, sondern daß ein zellfreier Extrakt aus Hefe Glucose in Äthanol umwandeln kann. Dieser Schritt war nicht nur theoretisch bedeutend, sondern ermöglichte auch ein viel handlicheres System zur Untersuchung der chemischen Reaktionen während der Gärung. Wenn man mit zellfreien Systemen arbeitet, kann man relativ leicht Reaktionspartner, von denen man annimmt, daß sie an der Reaktion beteiligt sind, zugeben oder entfernen; bei Verwendung von lebenden Zellen ist es oft schwierig oder sogar unmöglich, spezifische Verbindungen in unmodifizierter Form durch die Zellmembran zu transferieren.

Während der folgenden 40 Jahre wurden von vielen ausgezeichneten Biochemikern, einschließlich der Engländer Harden und Young und der

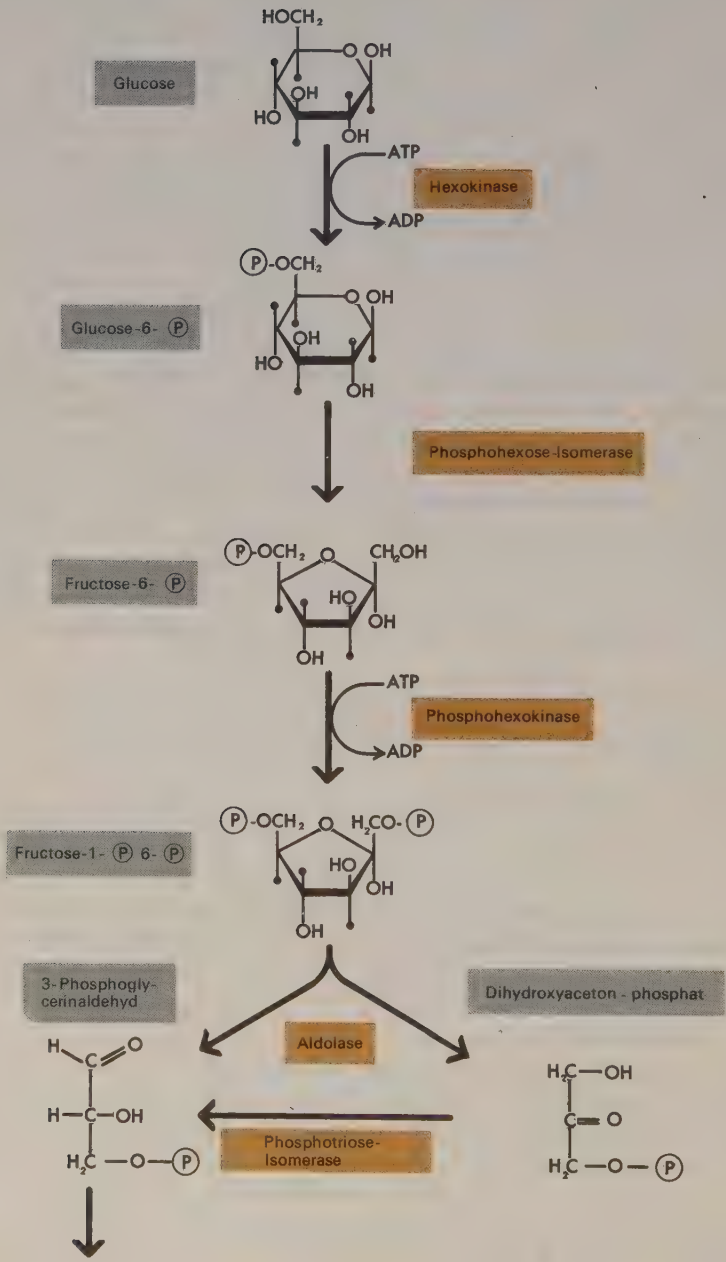
Deutschen Embden und Meyerhof, zellfreie Extrakte zur Ausarbeitung der genauen chemischen Vorgänge beim Glucoseabbau herangezogen (Abbildung 2-5). Während dieser Periode kristallisierte sich die wichtige Verallgemeinerung heraus, daß die beteiligten Reaktionen (zusammenfassend als Embden-Meyerhof Schema bezeichnet) nicht allein für die Alkoholgärung in Hefe spezifisch sind, sondern daß sie in vielen anderen Fällen, in denen Glucose verwertet wird, ebenfalls vorkommen. Die vielleicht bedeutendste Entdeckung wurde von Meyerhof gemacht. Er zeigte, daß bei der Muskelkontraktion in Abwesenheit von Sauerstoff das Reservekohlehydrat, Glykogen, über Glucose zu Milchsäure abgebaut wird (*anaerobe Glykolyse*). Dadurch wurde klar, daß nicht nur Mikroorganismen ihre Energie und Kohlenstoffverbindungen aus dem Embden-Meyerhof-Schema gewinnen, sondern daß die Energie, die an der Muskelkontraktion beteiligt ist, auf demselben Weg erzeugt wird. Ein Gefühl, das man oft die «Einheit der Biochemie» nannte, begann Fuß zu fassen. Wir verstehen darunter die Erkenntnis, daß die grundlegenden Reaktionen, von denen Zellwachstum und Zellteilung abhängig sind, in allen Zellen die gleichen, oder doch sehr ähnlich, sind, in Mikroorganismen genauso wie in denen höherer Pflanzen und Tiere. Für die scharfsinnigeren Biochemiker, die hauptsächlich mit den Auswirkungen der Evolutionstheorie beschäftigt waren, war diese Einheit keine Überraschung: wenn man als gegeben annimmt, daß Mensch und Fisch von gemeinsamen Ahnen abstammen, kann es nicht überraschen, daß viele ihrer Zellbestandteile ähnlich sind.

## BETEILIGUNG VON PHOSPHOR UND DIE BILDUNG VON ATP

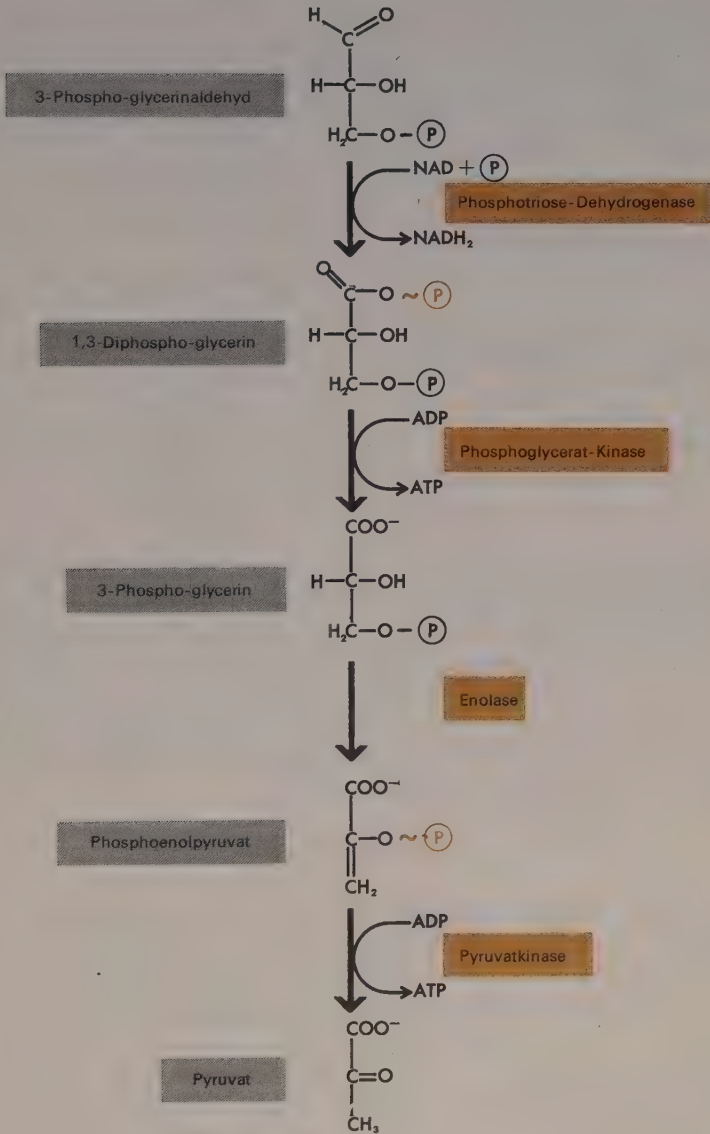
Schon 1905 wurde dem Phosphor eine essentielle Aufgabe im Stoffwechsel zugeschrieben. Harden und Young fanden zu dieser Zeit, daß die alkoholische Gärung nur in Gegenwart von anorganischem Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) stattfindet. Dieser Entdeckung folgte nach und nach die Isolierung vieler Produkte des Intermediärstoffwechsels, die  $\text{PO}_4^{3-}$  enthielten, wobei die P-Gruppe an Kohlenstoffatome über Phosphorsäureester-Bindungen gebunden war



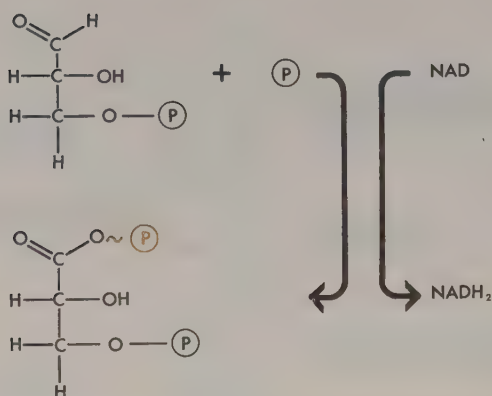
Die eigentliche Bedeutung der phosphorylierten Zwischenprodukte blieb 20 Jahre hindurch ungeklärt. Dann, ungefähr um 1930, erkannten Meyerhof und Lipmann die entscheidende Tatsache, daß es der Zelle mit Hilfe dieser Phosphorsäureester gelingt, einen Teil der Energie aus den chemischen Bindungen der Nahrungsmittelmoleküle zu speichern. Während der Gärung werden verschiedene Zwischenstufen gebildet (Abbildung 2-6), z.B. D-1,3-Diphosphoglycerinsäure, die sogenannte energiereiche Phosphat-







**ABBILDUNG 2-5** Der schrittweise Abbau der Glucose zu Pyruvat. Die Summe dieser Reaktions-,  
schritte wird oft als Embden-Meyerhof Schema bezeichnet.

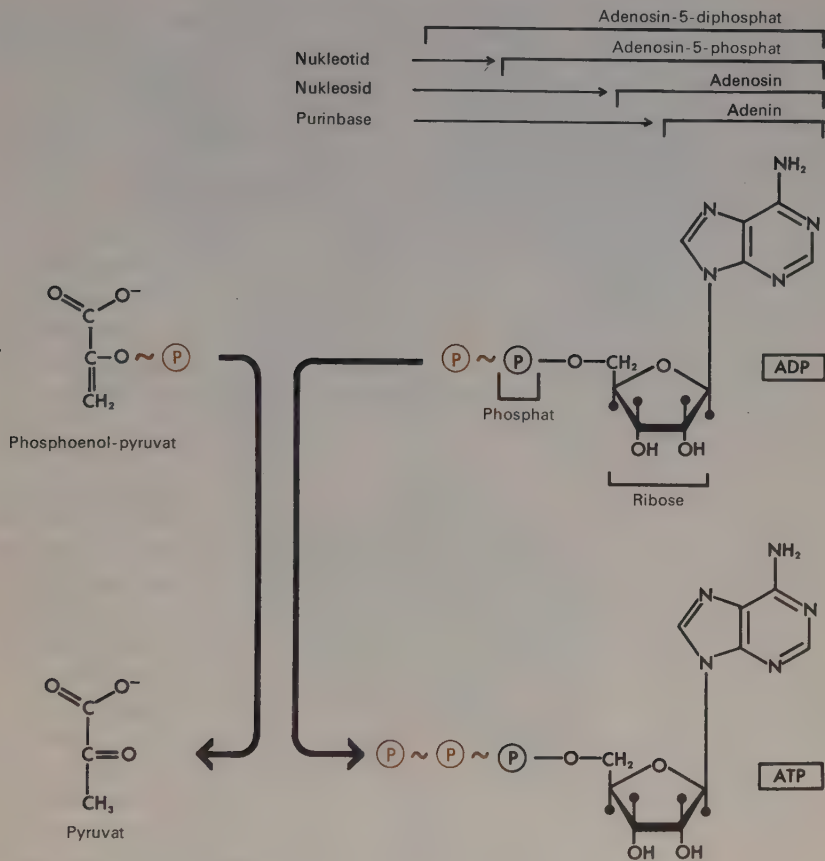


**ABBILDUNG 2-6** Die Bildung einer energiereichen Phosphatesterbindung, gekoppelt mit der Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd durch NAD.

bindungen enthalten (zusätzliche Details siehe Kapitel 5). Diese energiereichen Phosphatgruppen werden im allgemeinen auf Akzeptormoleküle übertragen, die dann als Quelle chemischer Energie lebenswichtige Zellvorgänge, wie Bewegung, Lichterzeugung und -wie wir in den Kapiteln 5 und 6 sehen werden-, verlaufenden Biosynthese notwendiger Zellbestandteile ermöglichen. Das wichtigste Akzeptormolekül ist Adenosindiphosphat (ADP, Abbildung 2-7). Aufnahme einer energiereichen  $\text{P}$ -Gruppe durch Adenosindiphosphat führt zu *Adenosintriphosphat* (ATP.)



Die Entdeckung der Rolle, die ADP als Akzeptormolekül und ATP als Donator von energiereichen Phosphatgruppen spielt, war eine der bedeutendsten der modernen Biologie. Bis die Rolle dieser Moleküle erkannt wurde, war man vollkommen im unklaren darüber, wie Zellen sich Energie beschafften. Es wurde ständig darüber spekuliert, wie die Existenz einer Zelle überhaupt mit dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik in Einklang zu bringen sei (in einem geschlossenen System steigt das Maß für die Unordnung, die Entropie, stetig an). Dieses anscheinende Paradoxon löste sich auf, sobald man sah, wie tierische Zellen die Energie aus den Nahrungsmittelmolekülen speichern und verwerten können. Es war zu dieser Zeit nicht bekannt, auf welche Weise die Sonnenenergie bei der Photosynthese gespeichert wird. Auch hier weiß man nun, daß die Hauptaufgabe der Sonnenenergie die Bildung von ATP ist.



**ABBILDUNG 2-7** Bildung von ATP (Adenosin-5'-triphosphat) aus ADP und einer energiereichen Phosphatbindung. Der Donator der energiereichen Bindung ist in diesem Fall Phosphoenol-pyruvat. Das Symbol ~ bedeutet, daß eine energiereiche Bindung vorliegt.

## DIE MEISTEN SPEZIFISCHEN REAKTIONEN IN EINER ZELLE ERFORDERN EIN SPEZIFISCHES ENZYM

Auf den Gedanken, daß die meisten spezifischen Schritte des Stoffwechsels auch ein spezifisches Enzym benötigen, kam man erst, als eine größere Anzahl spezifischer Reaktionen aufgeklärt war. Bei der Ausarbeitung des Embden-Meyerhof-Schemas wurde klar, daß jeder Schritt ein anderes

Enzym benötigt (siehe Abbildung 2-5). Jedes der Enzyme wirkt, indem es sich mit den Molekülen verbindet, die an einer bestimmten Reaktion beteiligt sind (den Substraten der Enzyme). So sind z.B. Glucose und ATP die Substrate des Enzyms Hexokinase. Wenn diese Moleküle an der Oberfläche der Hexokinase miteinander reagieren, wird die endständige Phosphatgruppe des ATP's unter Bildung von Glucose-6-phosphat auf ein Molekül Glucose übertragen. Das Wesen eines Enzyms liegt in seiner Fähigkeit, eine Reaktion zu beschleunigen (zu katalysieren), die eine bestimmte kovalente Bindung (eine Bindung, bei der die Atome durch gemeinsame Elektronenpaare zusammengehalten werden) knüpft oder spaltet. In Abwesenheit eines Enzyms sind die meisten kovalenten Bindungen eines biologischen Moleküls sehr stabil und werden erst bei sehr hohen, unphysiologischen Temperaturen gespalten: z.B. wird die Glucose in Abwesenheit eines Enzyms erst bei einigen hundert Grad Celsius durch  $O_2$  merklich oxydiert. Enzyme müssen daher irgendwie dadurch wirken, daß die Temperatur, bei der eine gegebene Bindung instabil wird, gesenkt wird. Ein Physikochemiker würde sagen, daß ein Enzym die Aktivierungsenergie herabsetzt. Wie das auf molekularer Ebene vor sich geht, ist noch nicht bekannt. Man kennt nun die 3-D-Struktur einiger Enzyme und es gibt plausible chemische Hypothesen über ihre Wirkungsweise. Man braucht daher nicht anzunehmen, daß neue, noch unentdeckte Gesetze der chemischen Wirkung eines Enzyms zugrunde liegen. Es gibt bereits zahlreiche Beispiele dafür, daß wohldefinierte Moleküle die Reaktion zwischen anderen Molekülen beschleunigen.

Ein äußerst wichtiges Charakteristikum der Enzyme ist die Tatsache, daß sie während einer Reaktion niemals verbraucht werden; sobald eine Reaktion beendet ist, sind sie wieder frei für die Adsorption neuer Moleküle und können ihre Wirkung wieder entfalten (Abbildung 2-8). Im Rahmen einer biologischen Zeitskala (Sekunden bis Jahre) können Enzyme sehr rasch arbeiten, wobei einige bis zu  $10^6$  Reaktionen pro Minute katalysieren können; in vielen Fällen käme es bei Abwesenheit von Enzymen in dieser Zeitspanne zu keiner wirksamen Kollision zwischen Substraten. Nicht alle enzymatischen Reaktionen sind jedoch spezifisch. Es gibt z.B. verschiedene Enzyme, die eine Anzahl verschiedener Proteine in ihre Untereinheiten, die Aminosäuren, spalten. Sie sind nur in dem Sinn spezifisch, daß sie die Spaltung einer ganz bestimmten kovalenten Bindung, der Peptidbindung, katalysieren und z.B. nicht die Phosphodiesterbindungen der Nukleinsäuren spalten.



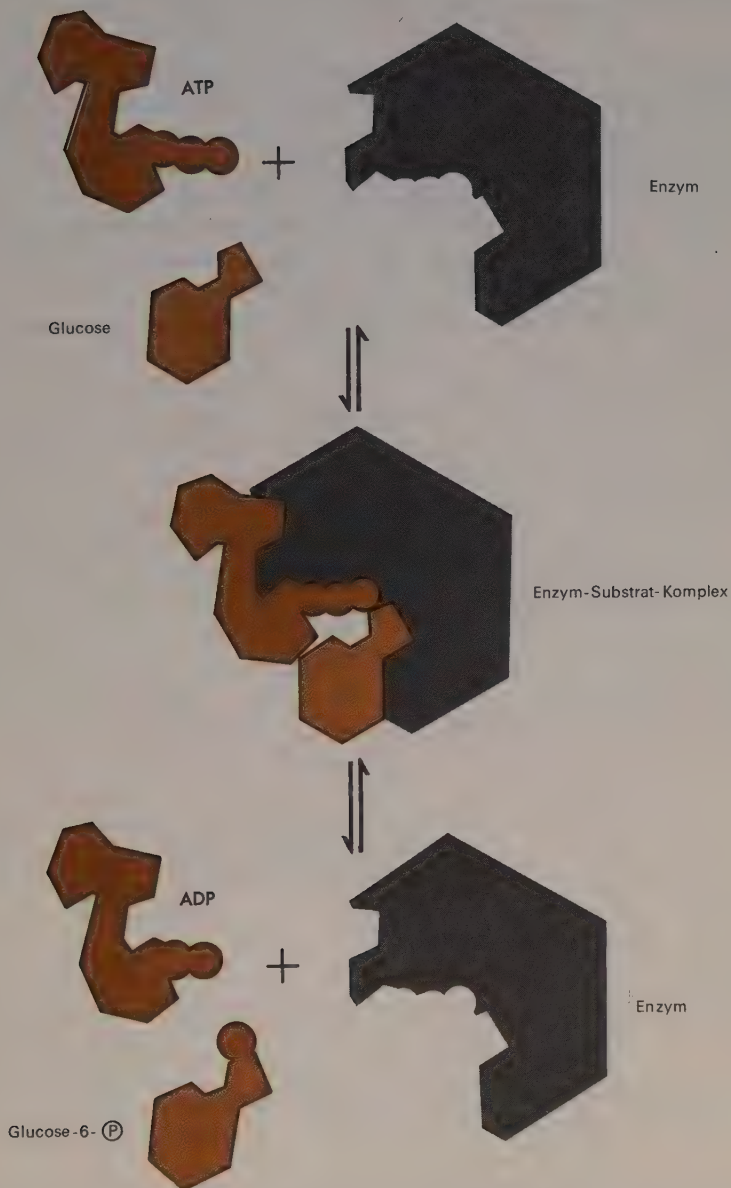
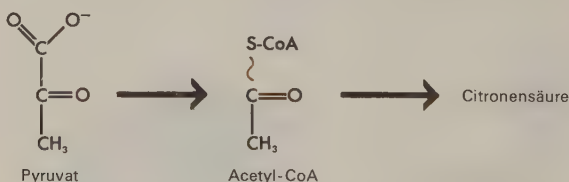


ABBILDUNG 2-8 Die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, gefolgt von Katalyse.

## DIE SCHLÜSSELPOSITION DER BRENZTRAUBENSÄURE: IHRE VERWENDUNG IM KREBS-ZYKLUS

Gleichzeitig mit den Untersuchungen der Gärung und der Glykolyse versuchte man, die Bildung von ATP in Anwesenheit von Sauerstoff zu verstehen. Aus Betrachtungen über die Mengen von ATP, die durch Gärung und Glykolyse gebildet wurden, folgte eindeutig, daß diese Vorgänge nur für einen kleinen Teil der Gesamtmenge an ATP, die in Anwesenheit von Sauerstoff gebildet wird, ausreichen. Das bedeutet, daß die ATP-Synthese in Anwesenheit von Sauerstoff nicht aufhört, sobald Glucose bis zur Brenztraubensäure (Pyruvat) abgebaut ist, sondern daß Brenztraubensäure selbst noch weiter umgewandelt werden muß und zwar durch energieliefernde Reaktionen, die die Anwesenheit von Sauerstoff erfordern.

Der erste entscheidende Durchbruch zum Verständnis dieser Vorgänge gelang mit den Entdeckungen der Biochemiker Szent György, Martius und Krebs. Ihre Arbeiten wiesen die Existenz einer zyklischen Reihe von Reaktionen nach (heute im allgemeinen als *Krebs-Zyklus* bezeichnet), durch die Pyruvat oxydativ zu  $\text{CO}_2$  abgebaut wird, unter Bildung einer Serie von Wasserstoffatomen, die paarweise an oxydierte Coenzyme gebunden werden. Bevor die Brenztraubensäure in den Krebs-Zyklus eintritt, wird sie in ein Schlüssel-Molekül, Acetyl-CoA (Abbildung 2-9) umgewandelt, die man vor Identifizierung ihrer chemischen Struktur «aktives Acetat» nannte. Diese wichtige Zwischenstufe, die Lipman, der damals in Boston arbeitete, 1949 entdeckte, verbindet sich mit Oxalacetat zu Citronensäure. Darauf werden in einer Serie von mindestens 9 zusätzlichen Schritten (siehe Abbildung



**ABBILDUNG 2-9** Die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA. CoA steht für Coenzym A. Die Reaktion, so wie sie hier beschrieben, ist stark vereinfacht. Verschiedene Schritte sind notwendig, an denen die Coenzyme Thiamin Pyrophosphat und Liponsäure beteiligt sind. Acetyl-CoA ist ein äußerst wichtiges Zwischenprodukt, da es nicht nur aus Glucose über Brenztraubensäure gebildet wird, sondern auch beim Fettsäureabbau.

\* Die Ausdrücke Brenztraubensäure und Pyruvat werden wechselweise verwendet. Eigentlich bezeichnet Pyruvat das negativ geladene Ion. Ebenso wird Milchsäure oft als Laktat, Glutaminsäure als Glutamat und Citronensäure als Citrat bezeichnet, etc.

2-10) 4 Paare von Wasserstoffatomen und 2 Moleküle  $\text{CO}_2$  gebildet. Die Paare von Wasserstoffatomen kommen nie frei vor, sondern werden auf bestimmte Coenzyme übertragen.

Man sollte den Krebs-Zyklus als einen Mechanismus betrachten, mit dessen Hilfe Acetyl-CoA zu zwei verschiedenen Arten von Reaktionsprodukten abgebaut wird: nämlich zu vollständig oxydiertem  $\text{CO}_2$ , welches nicht als Energiequelle herangezogen werden kann und zu den reduzierten Coenzymen, deren weitere Oxydation einen Großteil der Energie liefert, die in Gegenwart von Sauerstoff wachsende Organismen verbrauchen.

### **OXYDATION DER REDUZIERTEN COENZYME DURCH DIE ENZYME DER ATMUNGSKETTE**

Während des Krebs-Zyklus ist keine direkte Beteiligung von molekularem Sauerstoff notwendig. Sauerstoff ist erst beteiligt, wenn die Wasserstoffatome (oder Elektronen) durch eine zusätzliche Serie von Oxydations-Reduktions-Reaktionen weitergegeben worden sind. An diesen Vorgängen ist eine Reihe eng verbundener Enzyme beteiligt, die alle Eisenatome enthalten. Man nennt diese Enzyme oft zusammenfassend die Atmungsenzyme.

Es gab schon zu Ende des 19. Jahrhunderts Hinweise auf ihre Existenz, aber ihre Bedeutung wurde erst in der Zeit von 1925-1940 erkannt, hauptsächlich aufgrund der Arbeiten von Warburg und des gebürtigen Polen David Keilin, der den Großteil seiner wissenschaftlichen Laufbahn in England verbrachte. Es herrscht auch jetzt noch Unklarheit über die genaue Anzahl der beteiligten Enzyme. Die Richtigkeit des Konzepts wird aber nicht bestritten. Abbildung 2-11 zeigt die Grundzüge der Atmungskette.

Die Kette funktioniert mittels einer Reihe gekoppelter Oxydations-Reduktionsschritte, bei welchen jeweils Energie freigesetzt wird. Auf Diese Weise wird die Energie, die in den reduzierten Coenzymen steckt, nicht auf einmal, sondern in kleinen, diskreten Mengen entlassen. Wenn man  $\text{NADH}_2$  statt dessen direkt mit molekularem Sauerstoff oxydierte, würde eine große Energiemenge freigesetzt werden, die man unmöglich effektiv mit der Bildung energiereicher Bindungen des ATP's koppeln könnte.

### **SYNTHESE VON ATP IN ANWESENHEIT VON SAUERSTOFF (OXYDATIVE PHOSPHORYLIERUNG)**

In den Jahren 1925-1940 konzentrierten sich die meisten Biochemiker darauf, den Weg der Wasserstoffatome (oder Elektronen) bei den gekoppelten, energieliefernden Oxydations-Reduktionsvorgängen zu verfolgen. Bis zum Ende

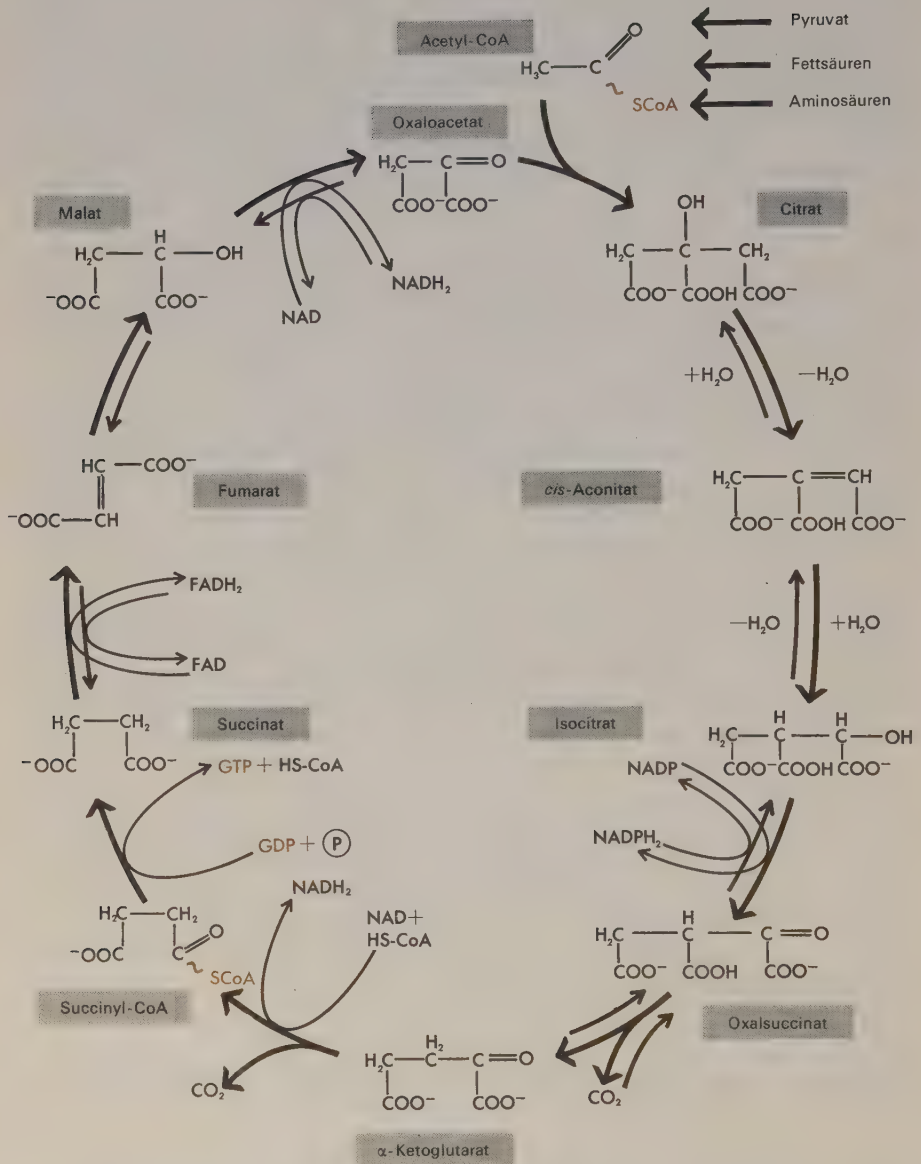
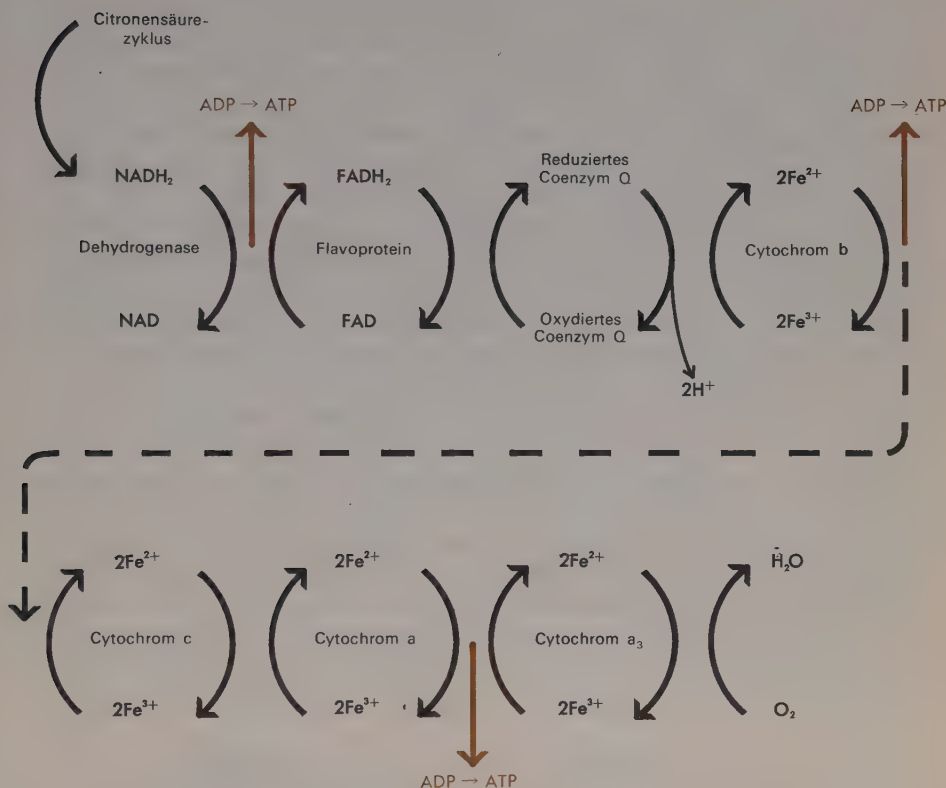


ABBILDUNG 2-10 Citronensäurezyklus (häufig Krebs-Zyklus genannt).





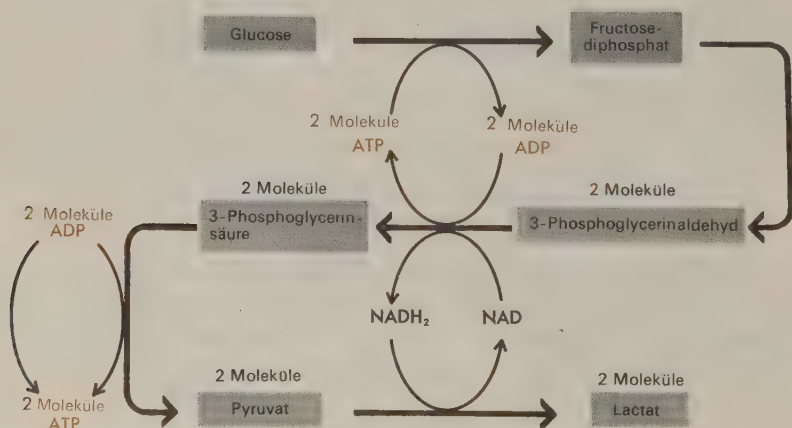
**ABBILDUNG 2-11** *Die Atmungskette. Es werden schematisch die aufeinander folgenden Oxydo-Reduktionsschritte gezeigt, welche in kleinen Mengen die Energie freisetzen, die in  $\text{NADH}_2$ -Molekülen enthalten ist. Es ist nicht bekannt, ob alle Cytochrome zu einem einzigen Zyklus gehören. Man weiß auch nicht eindeutig, an welchen Punkten des Zyklus ATP gebildet wird.*

dieser Periode wurde der Frage, wie die Energie in brauchbarer Form freigesetzt wird, wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Dann beobachteten jedoch der Däne Kalckar und der Russe Belitzer die Bildung von ATP gekoppelt mit Oxydations-Reduktionsschritten in zellfreien Systemen (1938-1940).

Die weitere Aufklärung ging langsam voran, da die meisten der beteiligten Enzyme nicht in reiner, löslicher Form isoliert werden konnten. Diese Schwierigkeiten wurden erst gehoben als man erkannte, daß der natürliche Ort der *oxydativen Phosphorylierung* in pflanzlichen und tierischen Zellen große, hochorganisierte, subzelluläre Partikeln, die *Mitochondrien*, sind. Wenn man intakte Mitochondrien verwendet, kann man leicht die oxydative Bildung von

ATP verfolgen; zum ersten Mal konnte das von den Amerikanern Lehninger und Kennedy 1947 gezeigt werden. Es gibt nun Beweise dafür, daß bei jedem Durchgang eines Paares von Wasserstoffatomen durch die Atmungskette 3 Moleküle ATP gebildet werden. Man nimmt aber an, daß mindestens 6 getrennte Oxydations-Reduktionsschritte an der Kette beteiligt sind. Künftige Arbeiten werden vielleicht zeigen, daß während jedes einzelnen Oxydations-Reduktionsschrittes 1 Molekül ATP gebildet wird.

Durch die Atmungskette wird ungefähr zwanzig Mal mehr Energie freigesetzt als während des ursprünglichen Abbaus der Glucose zu Pyruvat. Das erklärt, warum das Zellwachstum unter aeroben Bedingungen so viel besser vor sich geht als ohne Luftzufuhr. Wenn Sauerstoff fehlt, kann sich Pyruvat nicht ansammeln, da seine Bildung (siehe Abbildung 2-5) einen Vorrat von nicht reduziertem NAD erfordert. Die Menge NAD, die in einer Zelle vorhanden ist, ist aber —wie die anderer Coenzyme— sehr gering. In Abwesenheit von Sauerstoff wird sie rasch in  $\text{NADH}_2$  umgewandelt, wenn die Glucose nach dem Embden-Meyerhof-Schema oxydiert wird. Es muß daher für die fortgesetzte Bildung von ATP in Abwesenheit von Sauerstoff (Gärung) ein Ausweg gefunden werden, um das reduzierte  $\text{NADH}_2$  zu oxydieren. Oft geschieht das dadurch, daß Pyruvat selbst unter Verwendung von  $\text{NADH}_2$  als Wasserstoffdonator reduziert wird. Das erklärt das Auftreten von Milchsäure sowohl während der anaeroben Muskelkontraktion als auch während des Wachstums vieler Bakterien unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 2-12).



**ABBILDUNG 2-12** Glucosevergärung unter Bildung von Milchsäure. In diesem Fall wird  $\text{NADH}_2$ , das während der Brenztraubensäure-Bildung anfällt, unter Reduktion von Pyruvat zu Lactat oxydiert. In Anwesenheit von  $\text{O}_2$  wird  $\text{NADH}_2$  über die Atmungskette oxydiert und es bildet sich keine Milchsäure.

## BILDUNG VON ATP WÄHREND DER PHOTOSYNTHESE

Als Quelle der verschiedenen Nahrungsmittelmoleküle, die von Mikroorganismen und Tieren aufgenommen werden, dienen heutzutage letztlich die zur Photosynthese fähigen Pflanzen. Die Energie der Lichtquanten, die von der Sonne kommen, muß daher in irgendeiner Form in die Energie kovalenter Bindungen umgewandelt werden. Der chemische Mechanismus dieses Vorgangs blieb ungeklärt solange man die grundlegenden Energiebeziehungen bei Tieren und Bakterien nicht kannte. Hauptsächlich aufgrund der Arbeiten des amerikanischen Biochemikers Arnon fand man 1959, daß die Lichtquanten der Sonne primär die Phosphorylierung von ADP zu ATP bewirken.

Diese Phosphorylierung findet in den sogenannten Chloroplasten, komplizierten, chlorophyllhaltigen Zellpartikeln, statt, die man in den meisten Zellen findet, die fähig sind, Sonnenenergie in verwertbarer Form speichern zu können.

Man sieht daraus, daß die kontrollierte Freisetzung von Energie bei Pflanzen auf dem gleichen Trägermolekül für die Energie, nämlich ATP, beruht wie auch in bakteriellen und tierischen Zellen. Die Einzelheiten des Vorgangs sind noch ungeklärt. Ein anfänglicher Schritt in der Reaktionsfolge muß das Einfangen eines Lichtquants durch den grünen Farbstoff Chlorophyll sein, wobei eines seiner Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht wird. Was zwischen der ursprünglichen Adsorption von Energie und der Phosphorylierung von ATP passiert, muß größtenteils erst aufgeklärt werden.

Es ist sehr wichtig, daß man sich die Einmaligkeit der Photosynthese vor Augen hält. Sie ist der einzige bedeutende zelluläre Vorgang, bei dem andere Energiequellen herangezogen werden als die kovalente Bindung. Alle anderen wichtigen Zellvorgänge sind von der Abnahme der Energie, die in einer kovalenten Bindung enthalten ist, begleitet. Bei oberflächlicher Betrachtung könnten wir folglich annehmen, daß die Fähigkeit zur Photosynthese einer der wichtigsten Züge der ersten Formen des Lebens gewesen sein muß. Man kann sich jedoch nur schwer vorstellen, daß sehr frühe Formen die komplizierten Chloroplastenstrukturen haben konnten, die für die Photosynthese notwendig sind. Es gibt statt dessen Hinweise dafür, daß in der frühen Erdgeschichte eine einzigartige chemische Umgebung die Bildung einer großen Zahl kohlenstoffhaltiger Verbindungen ermöglichte, wozu die Energie von Lichtquanten von der Sonne herangezogen wurde. Diese spontan gebildeten organischen Moleküle dienten dann als Energiequelle (Nahrung) für die ersten Formen des Lebens. Sobald diese ursprünglich vorhandenen organischen Moleküle verbraucht waren und lebende Materie sich vermehrte, hatten diejenigen Zellen einen großen selektiven Vorteil, die zur Photosynthese befähigte Strukturen entwickelten und dadurch eine

Möglichkeit boten, die Menge an organischen Molekülen zu vergrößern. Heutzutage werden praktisch alle Glucosemoleküle unter Verwendung von chemischer Energie, die aus der Photosynthese stammt, synthetisiert.

## VITAMINE UND WACHSTUMSFAKTOREN

Obwohl einige Mikroorganismen, wie z.B. das Bakterium *Escherichia coli*, Glucose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden können, sind nicht alle Bakterien und keines der höheren Tiere in der Lage, Glucose für die Synthese aller notwendigen Stoffwechselprodukte heranzuziehen. So können Ratten 11 der 20 Aminosäuren, die in ihren Proteinen vorkommen, nicht selbst synthetisieren; ihre Nahrungsquelle muß daher bedeutende Mengen dieser Moleküle enthalten.

Zusätzlich dazu, daß Verbindungen mit bedeutenden Strukturaufgaben mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (notwendige Wachstumsfaktoren), werden auch häufig sehr kleine Mengen ganz bestimmter organischer Verbindungen benötigt. Man nennt diese Moleküle, von denen schon Spuren ausreichen, Vitamine (lebenswichtige Moleküle). Viele Jahre hindurch schienen sie recht geheimnisvoll. Heute wissen wir, daß sie in enger Beziehung zu den Coenzymen stehen. Manche sind Vorstufen für Coenzyme, andere sind selbst als Coenzyme wirksam. So wird das Vitamin Niacin für die Synthese von NAD gebraucht.

Da Coenzyme, wie Enzyme, immer wieder verwendet werden können ohne verbraucht zu werden, werden nur Spuren davon benötigt.

Es ist also nichts Ungewöhnliches daran, daß ein Molekül manchmal als Wachstumsfaktor oder als Vitamin benötigt wird; man kann diesen Bedarf chemisch erklären. Am wahrscheinlichsten ist, daß die Gene, die für die Synthese bestimmter Moleküle notwendig sind, während der Evolution verloren gingen; dadurch kam es zum Bedarf an spezifischen Wachstumsfaktoren. Das Beibehalten eines spezifischen Gens böte keinen selektiven Vorteil für einen Organismus, wenn das entsprechende Stoffwechselprodukt stets in ausreichender Menge in seiner Nahrung vorhanden ist.

## DIE LABILITÄT GROSSER MOLEKÜLE

Im auffallenden Gegensatz zu den brillanten Erfolgen der Biochemiker beim Verständnis des Verhaltens kleiner Moleküle, wie der Aminosäuren und der Nukleotide, waren die Wissenschaftler, die große Moleküle untersuchten, bis 1950 nur zu Teilergebnissen gekommen. Die einzigen wirklichen Erfolge betrafen die Untersuchungen einiger Polysaccharide (z.B. des Glykogens).



Diese waren relativ leicht zu verstehen, da sie durch regelmäßige Polymerisation aus kleinen Untereinheiten (z.B. Glucose) entstehen. Die Tatsache, daß man sie verstand, hatte jedoch keine besonderen Auswirkungen auf die Biologie, da Moleküle wie Glykogen in vielen Beziehungen uninteressant sind. Ihre einzige Aufgabe ist die, als Speicherform der energieliefernden Glucosemoleküle zu dienen. Die Moleküle, an deren Aufklärung man am meisten interessiert war, waren die Proteine, da viele von ihnen Enzyme sind, und die Nukleinsäuren, da man annahm, daß sie an dem Mechanismus der Vererbung beteiligt wären. Beide Molekülklassen widersetzten sich jedoch anfänglich allen Untersuchungen.

Einer der Gründe, warum sie so schwierig zu untersuchen waren, war, daß sie viel weniger stabil (labiler) als die meisten kleinen Moleküle zu sein schienen. Temperaturextreme und pH (sauer oder basisch) verursachen einen Verlust ihrer natürlichen Gestalt (*Denaturierung*) und führen dazu, daß sie manchmal irreversibel in inaktiver Form ausgefällt werden. Bei der Isolierung waren daher große Vorsichtsmaßnahmen notwendig; in manchen Fällen mußte der gesamte Isolierungs-Prozeß bei Temperaturen nahe 0 °C durchgeführt werden. Ursprünglich dachte man, daß nur Proteine denaturiert werden könnten, aber man weiß nun, daß auch Nukleinsäuren während der Isolierung denaturieren, wenn man keine geeigneten Vorsichtsmaßnahmen ergreift.

Bis 1945 (nach dem 2. Weltkrieg) wurden die üblichen Methoden der organischen Chemie zur Untersuchung der meisten kleinen Moleküle herangezogen. Der Erfolg eines Biochemikers, der den Intermediärstoffwechsel untersuchte, hing daher häufig von seinen Fähigkeiten als organischer Chemiker ab. Bei Arbeiten über Proteine und Nukleinsäuren griff man hingegen anfänglich nur selten auf die analytischen Methoden der organischen Chemie zurück. Ein Proteinchemiker mußte, bevor er überhaupt anfangen konnte, sich Gedanken über die Struktur des Proteins zu machen, sehr hart arbeiten, um sicher zu sein, daß sein Protein chemisch rein und biologisch aktiv war. Schonende Methoden für die Isolierung mußten ausgearbeitet werden, bei denen die in der organischen Analyse üblichen starken Säuren und Basen vermieden wurden. Er mußte auch Techniken zur Verfügung haben, um zu prüfen, ob das Produkt homogen war und, wenn möglich, welches Molekulargewicht es hatte. Für solche Antworten war die Hilfe der Physikochemiker unbedingt notwendig und es entwickelte sich eine anerkannte, neue Forschungsrichtung, die sich mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Makromolekülen in Lösung beschäftigt. Sie behandelt hauptsächlich Themen wie die osmotischen Eigenschaften makromolekularer Lösungen und die Bewegung von Makromolekülen im elektrischen Feld und im Schwerfeld.

Der vielleicht bedeutendste Beitrag der physikalischen Chemie zu den

Untersuchungen von biologischen Makromolekülen war, in den 20er Jahren, die Entwicklung von Zentrifugen, die mit hoher Geschwindigkeit rotierten (Ultrazentrifugen) und die eine rasche Sedimentation von Proteinen und Nukleinsäuren ermöglichten. Die Entwicklung der Ultrazentrifugen gelang dem Schweden Svedberg, nach dem die Einheit der Sedimentationsgeschwindigkeit ( $S$ =Svedberg) benannt ist. Ultrazentrifugen, die mit optischen Einrichtungen ausgestattet sind, mit deren Hilfe man genau beobachten kann, wie rasch ein Molekül sedimentiert, waren äußerst hilfreich für die Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen und bestätigten die Ansicht, daß Proteine, wie kleine biologische Moleküle, ein ganz bestimmtes Molekulargewicht und eine ganz bestimmte Gestalt haben. Diese Arbeiten bewiesen, daß die Größe von Proteinen sehr verschieden sein kann, und zwar variiert das Molekulargewicht kontinuierlich zwischen den Extremen von ca. 10.000 und 1.000.000.

## AUSWIRKUNGEN DER CHROMATOGRAPHIE

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts hatte der große deutsche Chemiker Emil Fischer durch seine Arbeiten bewiesen, daß Proteinmoleküle hauptsächlich aus Aminosäuren bestehen, die durch Peptidbindungen verknüpft sind. Bis 1951 war jedoch die genaue Art und Weise, auf die die Aminosäuren unter Bildung von Proteinen miteinander verknüpft sind, ein großes Rätsel. Das lag zum Teil daran, daß es 20 verschiedene Aminosäuren gibt, deren Mengenverhältnisse von Protein zu Protein verschieden sind. Ungefähr bis 1942 waren die methodischen Schwierigkeiten bei der Trennung und Identifizierung der Aminosäuren enorm und die meisten organischen Chemiker zogen es vor, mit einfacheren Molekülen zu arbeiten.

Die Lage änderte sich 1942 schlagartig, als die beiden Engländer Martin und Synge Trennungsmethoden entwickelten, die auf der relativen Löslichkeit der einzelnen Aminosäuren in zwei verschiedenen Lösungsmitteln (Verteilungschromatographie) beruhten. Besonders geeignet waren Methoden, bei denen die Aminosäuren auf Papierstreifen getrennt wurden. Mit Hilfe dieses neuen Tricks wurde es zur Routine, die 20 Aminosäuren, die man in Proteinen findet, quantitativ zu trennen. Diese Methoden wurden von dem englischen Biochemiker Sanger rasch aufgegriffen, und zur Bestimmung der Aminosäuresequenz des Protein hormons Insulin herangezogen (wegen Details über die Insulinstruktur siehe Kapitel 6). Sanger's Arbeit war ein Meilenstein der Proteinchemie, da sie zeigte, daß jede Art von Protein eine ganz bestimmte Aminosäureanordnung besitzt.

## DIE 25-JÄHRIGE EINSAMKEIT DER PROTEINKRISTALLOGRAPHEN

Ein ebenso bedeutsamer Schritt zum Verständnis von Makromolekülen gelang mit der erfolgreichen Anwendung röntgenkristallographischer Methoden auf die Untersuchung dieser Verbindungen. Die Methode bedient sich der Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen, um genaue Angaben über die 3-dimensionale Struktur von Atomen in einem Molekül zu geben. Die erste erfolgreiche Anwendung von Röntgenstrahlen für Strukturuntersuchungen gelang 1912 dem Engländer Bragg mit der Aufklärung der NaCl-Struktur. Der Erfolg führte rasch zu Untersuchungen an immer komplizierteren Molekülen.

Die Methode, die für die ersten Röntgenbeugungsuntersuchungen kleiner Moleküle herangezogen wurde, bestand darin, daß man eine bestimmte Struktur annahm und das Beugungsmuster berechnete, das die hypothetische Struktur zeigen sollte; schließlich wurde das berechnete mit dem tatsächlich beobachteten Beugungsmuster verglichen. Diese Methode war zwar für die Untersuchungen relativ einfacher Verbindungen, aber nicht für Untersuchungen größerer Strukturen geeignet. Die Aufklärung der Struktur einiger komplizierter anorganischer Silikate in den 20er Jahren erforderte viel Intuition von Seiten Braggs und des großen amerikanischen Chemikers Pauling. Trotzdem waren Proteine eindeutig viel zu kompliziert, als daß selbst die besten Chemiker ihre 3-dimensionale Struktur erraten konnten. Die ersten Proteinkristallographen wußten also, daß sie den ungeduldigen Biochemikern, die immer heftiger danach drängten, das wahre Aussehen der Proteine kennenzulernen, solange keine Ergebnisse zeigen konnten, bis neue Methoden zur Strukturuntersuchung gefunden wurden.

Die ersten ernsthaften Röntgenstrukturuntersuchungen an Proteinen begannen in der Mitte der 30er Jahre in Bernal's Laboratorium in Cambridge, England. Man fand dort, daß zwar trockene Proteinkristalle sehr schlechte Beugungsbilder geben, feuchte Kristalle dagegen oft sehr schöne. Es gab aber leider keine logische Methode zu ihrer Interpretation. Trotzdem sammelte ein Schüler Bernal's, der in England lebende Österreicher Perutz, mehr und mehr Daten für seine 1937 begonnene Arbeit über das Sauerstoff tragende Blutprotein Hämoglobin. Er hatte sich aus verschiedenen Gründen für Hämoglobin entschieden: es ist nicht nur eines der wichtigsten tierischen Proteine, man kann es auch leicht isolieren und es bildet Kristalle, die für kristallographische Untersuchungen besonders gut geeignet sind. Viele Jahre hindurch gab es jedoch weder bei der Arbeit von Perutz über die Struktur des Hämoglobins noch bei der 1947 begonnenen Arbeit Kendrews über das Muskelprotein Myoglobin besonders bedeutsame Ergebnisse. Myoglobin, das wie Hämoglobin Sauerstoff bindet, hatte den zusätzlichen Vorteil, daß es nur ein Viertel so groß (MG 17.000) wie Hämoglobin ist. Während



der langen, einsamen und ergebnislosen Periode gab es nur einen Triumph. Pauling zog aus stereochemischen Betrachtungen den richtigen Schluß, daß Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verknüpft sind, sich bisweilen in einer Helix anordnen. Er erklärte daher 1951 daß eine Helixstruktur, die er  $\alpha$ -Helix nannte (siehe Kapitel 4 wegen näherer Details), ein wichtiges Element der Proteinstruktur sei. Bald nach der Veröffentlichung der  $\alpha$ -Helix-Theorie wurde sie experimentell unterstützt, und zwar fand Perutz, daß einige synthetische Polypeptidketten, die nur aus einer Aminosäure aufgebaut sind, als  $\alpha$ -Helices vorliegen.

Eine Antwort auf ihre Fragestellung erhielten Perutz und Kendrew erst 1959. 1953 war ein wichtiger Durchbruch gelungen als man fand, daß man durch Bindung schwerer Atome an Proteinmoleküle von den Beugungsbildern direkt auf die richtige Struktur schließen konnte. Während der folgenden Jahre wurde die Methode der Substitution mit schweren Atomen mit einer Geschwindigkeit vorangetrieben, von der 20 Jahre vorher niemand geträumt hatte. Die Arbeit wurde auch dadurch wesentlich erleichtert, daß rasche Computer verfügbar wurden. Dann konnten zur Freude der wissenschaftlichen Welt endlich die Daten der Röntgenstrukturanalyse in die Anordnung der Atome im Myoglobin und, etwas weniger detailliert, im Hämoglobin übersetzt werden. Man fand, daß beide Moleküle unheimlich kompliziert sind, wobei die Aminosäuren in manchen Regionen als  $\alpha$ -Helix vorliegen, in anderen aber sehr unregelmäßig angeordnet sind. Man fand außerdem, daß ihre Konfiguration in allen Punkten denselben chemischen Gesetzen gehorcht, die auch die Gestalt kleinerer Moleküle bestimmen. Keine neuen Naturgesetze sind für den Aufbau von Proteinen notwendig; für die Biochemiker war dies keine Überraschung.

#### **AVERYS GROSSER DURCHBRUCH: NUKLEINSÄUREN KÖNNEN GENETISCHE INFORMATION TRAGEN**

Bis 1944 untersuchten viel weniger Chemiker Nukleinsäuren als Proteine. Man wußte, daß es zwei Arten von Nukleinsäuren gab, DNA (Desoxyribonukleinsäure - *deoxyribonucleic acid*) und RNA (Ribonukleinsäure - *ribonucleic acid*), aber die allgemeinen Grundzüge ihrer chemischen Struktur waren ungeklärt. Obwohl man DNA nur in Kernen fand (daher der Name, von *nucleus* = Kern), war man sich im allgemeinen darüber einig, daß sie wahrscheinlich als genetische Substanz nicht in Frage käme, da man glaubte, daß die 4 verschiedenen Nukleotide (siehe Kapitel 3 wegen struktureller Details) in gleichen Mengen vorhanden wären, was der DNA eine sich ständig wiederholende Struktur gegeben hätte, wie z.B. in Glykogen (die Tetranukleotidhypothese).



Mitte der 30er Jahre wiesen die schwedischen Chemiker Hammarsten und Caspersson mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden nach, daß DNA-Moleküle, die auf sehr schonende Weise isoliert worden waren, sogar höhere Molekulargewichte ( $> 500.000$ ) haben als die meisten Proteine. Gleichzeitig legten chemische Analysen gereinigter Pflanzenviren, die von dem Amerikaner Stanley und den Engländern Bawden und Pirie durchgeführt wurden, nahe, daß man allgemein sagen könnte, daß alle Viren Nukleinsäuren enthalten. Das war ein Hinweis dafür, daß Nukleinsäuren eine genetische Aufgabe haben könnten.

Der erste eindeutige Beweis für die genetische Rolle der Nukleinsäuren wurde jedoch durch die Arbeit des bekannten amerikanischen Mikrobiologen Avery und seine Mitarbeiter MacLeod und McCarty am Rockefeller Institut in New York erbracht. 1944 machten sie die ungeheuer bedeutende Entdeckung, daß die vererbaren Eigenschaften von Pneumokokken durch die Zugabe sorgfältig isolierter hochmolekularer DNA spezifisch verändert werden können. Obwohl man im ersten Augenblick zögerte, die tiefere Bedeutung dieser Entdeckung zu akzeptieren, regte sie doch enorm zum detaillierten chemischen Studium von Nukleinsäuren an. Auch hier war die Papierchromatographie äußerst nützlich. Mit ihrer Hilfe gelang es dem Biochemiker Chargaff, der damals in New York arbeitete, in kurzer Zeit die Nukleotidzusammensetzung der DNA verschiedener Organismen zu analysieren. Seine 1947 veröffentlichten Arbeiten zeigten nicht nur, daß die 4 Nukleotide nicht in gleichen Mengen vorhanden sind, sondern auch, daß die genauen Mengenverhältnisse der 4 Basen zueinander von Spezies zu Spezies verschieden sind. Diese Ergebnisse bedeuteten, daß es viel mehr Variationsmöglichkeiten zwischen DNA Molekülen gibt als die Tetranukleotidhypothese zuließ und wies unmittelbar auf die Möglichkeit hin, daß die genaue Anordnung der Nukleotide in einem Molekül im Zusammenhang mit seiner genetischen Spezifität steht.

Aus den Arbeiten, die Chargaff in den nächsten Jahren veröffentlichte, folgte auch, daß die relativen Mengenverhältnisse der 4 Basen nicht zufällig sind. Man fand, daß die Menge von Adenin in einer DNA-Probe der von Thymin entspricht und die Menge von Guanin der von Cytosin. Die grundlegende Bedeutung dieser Beziehungen wurde jedoch erst klar, als man der 3-dimensionalen Struktur der DNA mehr Aufmerksamkeit zuwandte.

## DIE DOPPELHELIX

Gleichzeitig mit den Arbeiten über die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen konzentrierte sich eine noch kleinere Arbeitsgruppe auf die Aufklärung der Beugungsmuster von DNA. Die ersten Röntgenaufnahmen wurden 1938

von den Engländer Astbury gemacht, der die DNA von Hammarsten und Caspersson erhalten hatte. Die ersten qualitativ wirklich guten Aufnahmen erhielten aber Wilkins und Franklin am King's College in London erst nach dem Krieg (1950-1952). Damals waren die chemischen Bindungen, die die Nukleotide miteinander verknüpfen, noch nicht eindeutig bekannt. Sie wurden erst 1952 von einer Gruppe organischer Chemiker im Laboratorium von Alexander Todd in Cambridge, England, aufgeklärt.

Aus dem Interesse an der Pauling'schen  $\alpha$ -Helix Struktur entwickelte sich 1951 eine elegante Theorie über das Beugungsmuster von Molekülen mit Helixstruktur. Das Vorhandensein dieser Theorie ermöglichte es, die verschiedenen in Frage kommenden DNA-Strukturen auf einer «trial and error» Basis zu untersuchen. Die richtige Antwort, eine komplementäre Doppelhelix (siehe Kapitel 9 für Details) fanden Crick und Watson 1953, die damals in England im Laboratorium von Perutz und Kendrew arbeiteten. Um zur richtigen Lösung zu kommen, mußten sie hauptsächlich die stereochemisch günstigste Konfiguration finden, die mit den röntgenographischen Aufnahmen der Gruppe vom King's College übereinstimmen.

Die Entdeckung der Doppelhelix führte unmittelbar zu einer tiefgreifenden Revolution in der Datenauswertung vieler Genetiker. Das Gen war nicht länger etwas Geheimnisvolles, dessen Verhalten man nur durch Züchtungsversuche untersuchen konnte. Es wurde statt dessen zu einem ganz realen molekularen Gegenstand, über den die Chemiker ebenso objektiv nachdenken konnten wie über kleine Moleküle, wie Pyruvat oder NAD. Ein Großteil der Erregung war aber nicht nur darauf zurückzuführen, daß die Struktur nun bekannt war, sondern war aus der ganz besonderen Art dieser Struktur zu erklären. Bevor man die Antwort kannte, hatte man doch immer befürchtet, daß sie ganz gewöhnlich sein werde und nichts über die Art und Weise, auf die Gene sich replizieren und funktionieren, aussagen würde. Glücklicherweise war aber die Lösung äußerst aufregend: Die Struktur bestand offensichtlich aus zwei ineinander gedrehten komplementären Strängen, woraus man schließen konnte, daß ein Strang als die spezifische Oberfläche (*Matrize*, *Template*) dient, auf der der andere Strang gemacht wird. Wenn aber diese Hypothese stimmte (und man weiß nun, daß sie stimmt!), war das grundlegende Problem der Genreplikation, über das die Genetiker während so vieler Jahre gerätselt hatten, in der Tat geklärt. Während der letzten 12 Jahre wurde deshalb eine Reihe von Versuchen mit dem Ziel begonnen, auf molekularer Ebene zu studieren, auf welche Weise die DNA die Eigenschaften einer Zelle bestimmt. Diese Versuche lieferten Ergebnisse über die Funktionsweise des genetischen Materials, die man sich 1953 kaum hätte vorstellen können. Da diese Ergebnisse zum ersten Mal durchwegs die molekulare Ebene erfassen, wollen wir die Behandlung des Themas auf eben dieser Ebene als molekulare Genetik bezeichnen.

## DAS ZIEL DER MOLEKULARBIOLOGIE

Bis vor kurzem schien die Vererbung die geheimnisvollste Eigenschaft des Lebens zu sein. Die gegenwärtige Erkenntnis, daß die Struktur der DNA es uns jetzt schon erlaubt, praktisch alle ihre Grundzüge auf molekularer Ebene zu verstehen, ist daher von größter Bedeutung. Wir sehen nicht nur, daß die Gesetze der Chemie für das Verständnis der Proteinstruktur ausreichen, sondern daß sie auch im Einklang mit allen bekannten Phänomenen der Vererbung stehen. Heute sind praktisch alle Biochemiker davon überzeugt, daß auch die anderen Eigenschaften lebender Organismen (z.B. selektive Permeabilität der Zellmembran, Muskelkontraktion, Nervenleitung und Hör- und Erinnerungsvorgänge) im Rahmen des Zusammenwirkens von großen und kleinen Molekülen vollständig verstanden werden können. Über die weniger komplizierten Eigenschaften ist schon Einiges bekannt, genug, um in uns den Glauben zu bestärken, daß künftige Untersuchungen, wenn sie mit der gleichen Intensität betrieben werden wie seit kurzem die genetischen Probleme, dem Menschen letztlich die Möglichkeit geben werden, die wesentlichen Grundzüge des Lebens vollständig zu beschreiben.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Wachstum und Teilung der Zellen beruhen auf denselben chemischen Gesetzen, die auch das Verhalten von Molekülen außerhalb einer Zelle bestimmen. Zellen enthalten keine Atome, die ausschließlich auf den lebenden Organismus beschränkt sind: sie synthetisieren keine Moleküle, die ein Chemiker in inspirierter harter Arbeit nicht eines Tages machen könnte. Es gibt daher keine Chemie, die für die lebende Zelle spezifisch wäre. Ein Biochemiker ist nicht jemand, der besondere chemische Gesetze untersucht, sondern er ist ein Chemiker, der am Verhalten von Molekülen, die man in Zellen findet (biologischen Molekülen) interessiert ist. Wachstum und Teilung einer Zelle hängen davon ab, daß chemische Energie in einer verwertbaren Form zur Verfügung steht. Diese Energie stammt ihrerseits ursprünglich aus Lichtquanten von der Sonne, die durch photosynthetisierende Pflanzen in zelleigenen Molekülen gespeichert wird, die dann verschiedenen Mikroorganismen und Tieren als Nahrungsquelle dienen. Die eindrucksvollsten anfänglichen Triumphe der Biochemiker zeigten, auf welche Weise Nahrungsmittelmoleküle in andere zelleigene Moleküle und in verwertbare Formen chemischer Energie umgewandelt werden können. Die Energie der Nahrungsmittelmoleküle ist hauptsächlich in den kovalenten Bindungen reduzierter Kohlenstoffverbindungen enthalten; sie wird freigesetzt, wenn diese Moleküle durch Oxydations-Reduktionsvorgänge in Kohlenstoffverbindungen einer höheren Oxydationsstufe umgewandelt werden. Für die meisten*



Organismen ist molekularer Sauerstoff das wesentlichste Oxydationsmittel. Die Endprodukte der vollständigen Oxydation organischer Moleküle, z.B. der Glucose, sind  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die meisten organischen Verbindungen werden allerdings nicht direkt durch Sauerstoff oxydiert. Statt dessen werden sie durch viele verschiedene organische Moleküle oxydiert, die häufig Coenzyme wie NAD sind. Das reduzierte Coenzym (z.B.  $\text{NADH}_2$ ) wird selbst durch ein anderes Molekül (wie FAD) oxydiert, wobei ein neues reduziertes Coenzym ( $\text{FADH}_2$ ) und das ursprüngliche Coenzym in seiner oxydierten Form (NAD) entstehen. Nach mehreren solchen Zyklen greift molekularer Sauerstoff direkt ein und beendet die Oxydations-Reduktionskette, wobei Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entsteht.

Die Energie wird während des Oxydations-Reduktionszyklus nicht nur als Wärme freigesetzt. Mehr als ihre Hälfte wird statt dessen in neue chemische Bindungen umgewandelt.

Phosphor nimmt eine Schlüsselposition bei diesen Umwandlungen ein. Die Phosphatester, die gebildet werden, haben einen höheren Gehalt an verwertbarer Energie als die meisten anderen kovalenten Bindungen. Diese Phosphatgruppen werden in energiereicher Form auf Akzeptormoleküle übertragen. Der wichtigste Akzeptor dieser Art ist ADP; durch Übertragung einer Phosphatgruppe auf ADP entsteht ATP. Erst vor kurzem wurde experimentell nachgewiesen, daß die Phosphorylierung von ADP zu ATP ein Primärschritt der Photosynthese ist; man verwendet dafür die Bezeichnung Photophosphorylierung. Die  $\text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$ -Umwandlung steht im Zentrum aller Energiebeziehungen aller Zellen.

Bis vor ein paar Jahren war das Verständnis der Chemiker von zellulären Makromolekülen, wie Proteinen und Nukleinsäuren, wesentlich weniger gut fundiert als heute. Die meisten Molekulargewichte dieser Klasse liegen um mehrere Größenordnungen höher als die der größten «kleinen Moleküle», die in der organischen Chemie untersucht werden. (MG der Proteine und Nukleinsäuren liegen zwischen  $10^4$  und  $10^9$ .) Sowohl Proteine als Nukleinsäuren sind komplizierte Verbindungen und es gelang erst vor kurzem, physikalische und chemische Methoden zu entwickeln, welche konzertierte Versuche zur Aufklärung ihrer Struktur ermöglichten. Zu den bedeutendsten Methoden zur Untersuchung von Makromolekülen gehören Verteilungschromatographie, analytische Ultrazentrifugation und Röntgenkristallographie. Es sind nun praktisch alle wichtigen Grundzüge des Proteins Myoglobin und des primären genetischen Materials DNA bekannt. In beiden Fällen sind die chemischen Gesetze, die für kleine Moleküle gelten, ebenfalls anwendbar. Der bisher größte Einfluß auf die biologische Denkweise kam von der Erkenntnis, daß DNA eine komplementäre Doppelhelix-Struktur besitzt. Diese Struktur wies unmittelbar auf einen Mechanismus für die Replikation von Genen hin und führte zu einer Revolution in der Vorstellung der Biologen über die Vererbung. Diese Erfolge führten zu der Überzeugung, daß die gegenwärtige Erweiterung unserer Kennt-



nisse biologischer Phänomene auf die molekulare Ebene (Molekularbiologie) uns in Kürze die Möglichkeit geben wird, alle Grundzüge des Lebens zu verstehen.

## LITERATUR

- McElroy, W. D., *Cell Physiology and Biochemistry*, 2. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964. Eine knappe Einführung in viele wichtige Prinzipien der Biochemie.
- Lehninger, A. L., *Bioenergetics*, Benjamin, New York, 1965. Eine Einführung in die chemischen Reaktionen, mit welchen Zellen Energie einfangen, speichern und verwenden. Die Entstehung von ATP in Mitochondrien und Chloroplasten ist besonders betont.
- Bennett, T. P., und E. Frieden, *Modern Topics in Biochemistry*, Macmillan, New York, 1966. Eine gute Einführung in die Biochemie für Anfänger.
- Baldwin, E., *Dynamic Aspects of Biochemistry*, 3. Aufl., Cambridge, New York, 1959. Einer der wenigen biochemischen Texte, die man mit Recht als Klassiker bezeichnen darf. Jetzt liest man es am besten, um zu erfahren, auf welche Weise Coenzyme am Transfer von Wasserstoff beteiligt sind.
- Conn, E. E., und P. K. Stumpf, *Outlines of Biochemistry*, Wiley, New York, 1963. Ein einführendes Lehrbuch das Stoffwechselwege betont.
- Kamen, M. D., *Primary Processes in Photosynthesis*, Academic, New York, 1963. Eine knappe Abhandlung in Taschenbuchformat über das, was wir über Photosynthese wissen und nicht wissen.
- Kaleker, H. M., *Biological Phosphorylations*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Enthält eine Sammlung vieler klassischer Arbeiten, die zum Verstehen der vielfachen Bedeutung energiereicher Phosphatbindungen führten.

# 3

## DIE BAKTERIENZELLE AUS DER PERSPEKTIVE DES CHEMIKERS

Die wichtigste Eigenschaft lebender Zellen ist ihre Tendenz, zu wachsen und sich zu teilen. Während dieses Vorgangs werden Nährstoffmoleküle aus der Umgebung aufgenommen und in Zellbestandteile umgewandelt. Die Wachstumsgeschwindigkeiten von Zellen variieren sehr stark, im allgemeinen wachsen aber die kleinsten Zellen am schnellsten. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich die Zellzahl mancher Bakterien alle 20 Minuten, wogegen die meisten größeren Säugetierzellen sich nur einmal innerhalb von 24 Stunden teilen können. Aber unabhängig von der Zeitspanne bedeuten Wachstum und Zellteilung notwendigerweise, daß sich die Zahl der Zellmoleküle mit jeder Generation verdoppelt. Man könnte die Frage «Was ist Leben» also auch so formulieren, daß man fragt, auf welche Weise die Zellen ihren molekularen Inhalt verdoppeln, das heißt, auf welche Weise biologische Moleküle während des Zellwachstums repliziert werden.

### BAKTERIEN WACHSEN UNTER EINFACHEN, WOHL-DEFINIERTEN BEDINGUNGEN

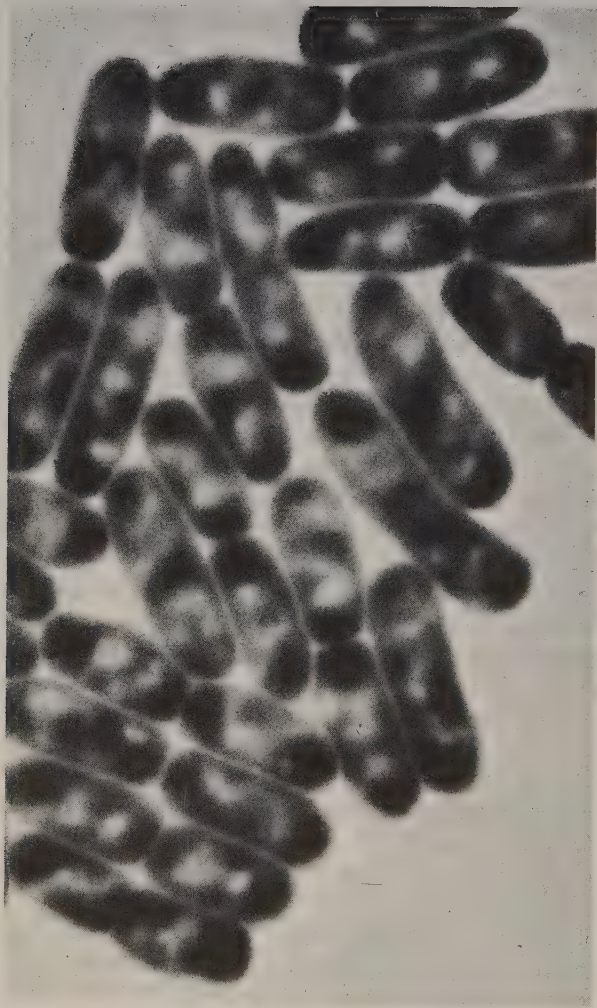
Die wichtigsten Fragen des Zellwachstums und der Teilung werden heutzutage an Mikroorganismen, hauptsächlich an Bakterien, untersucht. Die Bevorzugung von Mikroorganismen kommt nicht daher, daß man sie für grundsätzlich wichtiger als höhere Organismen hält. Für den Menschen ist offensichtlich das Gegenteil der

Fall, da er natürlich am meisten an sich selbst interessiert und begierig ist, die Informationen über seinen chemischen Aufbau zur Bekämpfung der verschiedenen Krankheiten, die seine Existenz bedrohen, zu verwenden.

Aber sogar bei oberflächlicher Betrachtung sind die Schwierigkeiten, die mit der Beherrschung chemischer Vorgänge in einem höheren Organismus verbunden sind, überwältigend. Es gibt ungefähr  $5 \times 10^{12}$  Zellen im menschlichen Organismus und die Existenz jeder einzelnen steht in innigem Zusammenhang mit dem Verhalten vieler anderer Zellen. Daher ist es schwierig, das Wachstum einer Zelle in einem vielzelligen Mechanismus zu studieren, ohne den Einfluß in Betracht zu ziehen, den die umliegenden Zellen auf sie ausüben.

Man bemühte sich sehr, Methoden zu finden, um Zellen eines vielzelligen Organismus in einem isolierten System zu züchten. Bei dieser Arbeitsweise (Gewebekultur) wird eine kleine Anzahl von Zellen oder manchmal eine einzige Zelle einer Pflanze oder einem Tier entnommen und unter kontrollierten Laboratoriumsbedingungen in eine Lösung mit verschiedenen Nährstoffen gebracht. In den ersten Versuchen dieser Art starben die isolierten Zellen fast durchwegs, aber heute, dank besserer Kenntnis der Ernährungsbedingungen von Zellen, wachsen sie und teilen sich oft zu einer großen Zahl neuer Zellen. Diese isoliert wachsenden pflanzlichen und tierischen Zellen waren von großem Wert, da sie zeigten, wie Zellen sich zu organisierten Verbänden ähnlicher Zellen (Gewebe) aggregieren können und, was noch eindrucksvoller ist, wie Gewebe sich im Reagenzglas vereinigen, um Strukturen, die morphologisch mit kleinen Regionen von Organen, wie Leber oder Niere, identisch sind, zu bilden. Andererseits sind Zellen einer Gewebekultur für das Studium des Zellwachstums und der Teilung nicht ideal. Obwohl nämlich viele Zellen höherer Organismen isoliert wachsen können, muß man sich doch vor Augen halten, daß das nicht ihr Normalzustand ist und wenn man keine Vorbeugungsmaßnahmen trifft, neigen sie dazu, sich in Kürze zu multizellulären Verbänden zu aggregieren. Es ist daher auch heute noch manchmal schwierig und zeitraubend, Zellen höherer Organismen isoliert zu züchten.

Im Gegensatz dazu wachsen Zellen von Mikroorganismen oft frei, als einzelne Zellen, die sich sofort nach der Zellteilung voneinander trennen. Es ist daher relativ einfach, die Zellen solcher einzelliger Organismen unter wohl definierten Laboratoriumsbedingungen zu züchten, da die Wachstumsbedingungen im Reagenzglas sich nicht wesentlich von den natürlicher Bedingungen außerhalb des Laboratoriums unterscheiden. Im Gegensatz zu Säugetierzellen, die eine große Anzahl von Wachstumszusätzen benötigen, wachsen viele Bakterienzellen auf einem einfachen, wohl-definierten Nährstoff oder Medium. So wächst z.B. das Bakterium *Escherichia coli* auf einer wäßrigen Lösung nur von Glucose und einigen anorganischen Ionen (Tabelle 3-1).



**ABBILDUNG 3-1** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gruppe intakter *E. coli* Zellen. Die hellen Zonen im Innern einer Zelle stellen Regionen dar, in denen DNA konzentriert ist (12.000 fache Vergrößerung). Die Aufnahme wurde im Laboratorium von E. Kellenberger an der Genfer Universität gemacht (genehmigte Reproduktion).



**TABELLE 3-1.** Ein einfaches synthetisches Nährmedium für *E. coli*.

NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,13 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g
Glucose	4,0 g
Wasser	1.000 ml

<sup>a</sup> Spuren anderer Ionen (z.B. Fe<sup>2+</sup>) werden ebenfalls für das Wachstum benötigt. Sie werden aber im allgemeinen nicht extra zugesetzt, da sie normalerweise als Verunreinigung der anorganischen Salze oder des Wassers selbst vorhanden sind.

Das Wachstum einer bestimmten Bakterienzelle ist gewöhnlich vom Vorhandensein einer ganz bestimmten Kohlenstoffquelle unabhängig. Die meisten Bakterien sind sehr anpassungsfähig im Bezug auf die Verwertung verschiedener organischer Moleküle als Kohlenstoff und Energiequelle. Glucose kann durch eine Reihe anderer organischer Moleküle ersetzt werden. Je größer die Vielfalt der angebotenen Nährstoffmoleküle, desto rascher wächst die Zelle. So braucht z.B. *E. coli*, wenn es nur auf Glucose wächst, bei 37° C ungefähr 60 Minuten zur Verdoppelung seiner Zellmasse. Wenn Glucose hingegen durch die verschiedenen Aminosäuren und Purin- und Pyrimidinbasen (die Vorstufen der Nukleinsäuren) ergänzt wird, sind nur 20 Minuten zur Verdoppelung der Zellmasse notwendig. Das ist darauf zurückzuführen, daß diese Komponenten direkt in die Proteine und Nukleinsäuren eingebaut werden können und die Zelle diese Bausteine nicht selbst synthetisieren muß. Es gibt jedoch eine untere Grenze für die Zeit, die eine Zelle braucht, um ihre Masse zu verdoppeln (oft Generationszeit genannt). Gleichgültig wie günstig die Wachstumsbedingungen sind, kann sich eine Bakterienzelle nicht öfter als alle 20 Minuten teilen.

### **E. COLI IST DER ORGANISMUS, DESSEN MOLEKULARE GRUNDLAGEN AM BESTEN BEKANNT SIND**

Während der letzten 20 Jahre haben sich die Untersuchungen hauptsächlich auf das Bakterium *E. coli* und in der Evolution verwandte Organismen konzentriert. Da es relativ klein, unter normalen Bedingungen für die meisten Organismen nicht pathogen und leicht unter Laboratoriumsbedingungen zu Züchten ist, ist *E. coli*, abgesehen vom Menschen, heute der am intensivsten studierte Organismus.

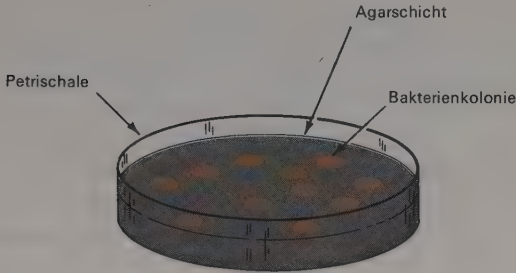
Es besitzen natürlich auch viele andere Bakterien die gleichen günstigen Eigenschaften und daß die Wahl ursprünglich auf *E. coli* fiel, war rein zufällig. Sobald aber ernsthafte Untersuchungen an *E. coli* begonnen hatten, wäre es unsinnig gewesen, auf einen anderen Organismus überzugehen, wenn

man nicht aus anderen Gründen dazu gezwungen war. Die Tendenz, *E. coli* zu untersuchen, nimmt auch heute noch zu, da gleichzeitig mit den chemischen Untersuchungen auch erfolgreiche genetische Analysen durchgeführt wurden. Die Genetik von *E. coli* ist deshalb wesentlich besser bekannt als die irgend eines anderen Bakteriums oder einer niederen Pflanze. Wie wir sehen werden, sind die kombinierten Methoden der Genetik und der Biochemie so aussagekräftig, daß es häufig einfach sinnlos ist, biochemische Untersuchungen an einem Organismus durchzuführen, der für genetische Analysen unzugänglich ist.

Die durchschnittliche *E. coli*-Zelle (Abbildung 3-1) ist stäbchenförmig, 2  $\mu$  lang und 1  $\mu$  im Durchmesser. Die Zelle wächst indem sie länger wird und schließlich durch Teilung zwei gleich lange Zellen gibt. Das Wachstumsoptimum liegt bei 37° C, woraus sich vielleicht die Eignung zum Überleben in den Eingeweiden höherer Säugetiere, in denen *E. coli* oft als harmloser Parasit vorkommt, ergibt. Es kann aber auch bei so tiefen Temperaturen wie 20° normal wachsen und sich teilen. Das Zellwachstum geht aber bei diesen niedrigen Temperaturen wesentlich langsamer vor sich; bei 20° ist die Generationszeit unter sonst optimalen Bedingungen ungefähr 120 Minuten.

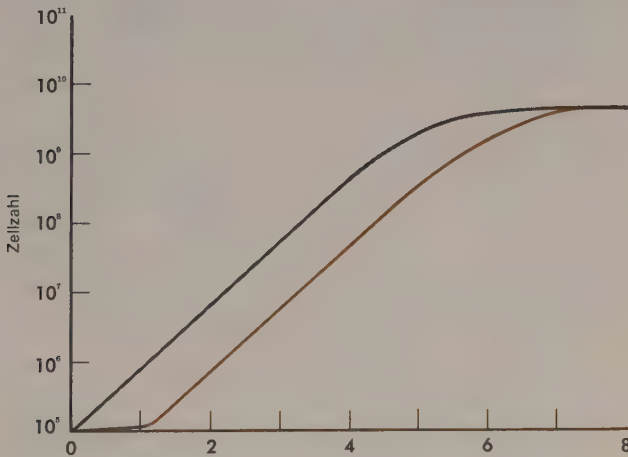
Zellzahl und -größe werden oft durch Beobachtung im Lichtmikroskop und seltener im Elektronenmikroskop verfolgt. Mit diesen Methoden kann man jedoch nicht feststellen, ob die sichtbare Zelle lebt oder tot ist. Man kann das nur daraus sehen, ob eine gegebene Zelle Tochterzellen hervorbringt. Meistens wird zu diesem Zweck eine kleine Zahl von Zellen auf eine feste Agaroberfläche aufgetragen (Abbildung 3-2), zu welcher die Nährstoffe, die für das Zellwachstum notwendig sind, zugesetzt wurden. Wenn eine Zelle lebt, wächst sie und führt zu zwei Tochterzellen, die ihrerseits zu weiteren Tochterzellen führen. Das Ergebnis ist, daß sich nach einer Inkubationszeit von 12 bis 24 Stunden bei 37° C diskrete Massen (Kolonien) von Bakterienzellen bilden. Vorausgesetzt, daß diese Kolonien nicht überlappen, kann man annehmen, daß jede ursprünglich aus einer einzigen Zelle entstanden ist.

Man kann das Wachstum von Bakterien auch in flüssigen Nährmedien verfolgen. Inokuliert man ein geeignetes Medium mit einer kleinen Zahl sich rasch teilender Bakterien aus einem ähnlichen Medium, so teilen sich diese Zellen mit konstanter Geschwindigkeit weiter, wobei die Zellzahl sich innerhalb jeder Generationszeit verdoppelt. Die Zahl der Bakterien wächst daher exponentiell (logarithmisch) (Abbildung 3-3). Das exponentielle Wachstum geht so lange vor sich bis die Zellzahl so groß geworden ist, daß die ursprünglichen optimalen Bedingungen im Nährmedium nicht mehr gegeben sind. Einer der ersten limitierenden Faktoren für das Wachstum ist im allgemeinen die Sauerstoffzufuhr. Bei niedrigen Zellzahlen genügt der Sauerstoff, der durch Diffusion von der Grenzfläche her im Medium



**ABBILDUNG 3-2** Die Vermehrung einzelner Bakterien zu Kolonien. *E. coli*-Zellen können sich im allgemeinen nicht fortbewegen. Wenn sich daher die Zelle auf einer festen Oberfläche teilt, bleiben die beiden Tochterzellen und ihre ganze Nachkommenschaft nahe beisammen. Nach 24 Stunden bei 37° C hat sich aus jeder lebenden Zelle eine Kolonie gebildet.

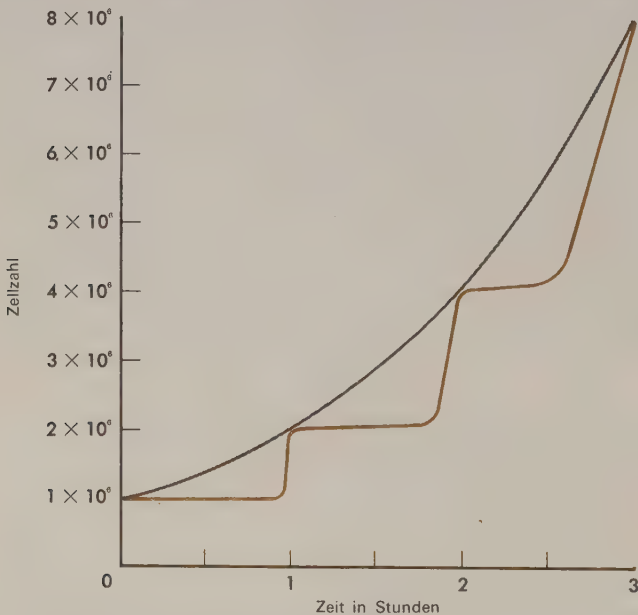
zur Verfügung steht; steigt die Zellzahl jedoch an, wird zusätzlich Sauerstoff benötigt. Man kann die Zufuhr durch Durchleiten von Sauerstoff oder rasches Schütteln der Lösung erhöhen. Aber selbst bei heftiger Lüftung sinkt die Wachstumsgeschwindigkeit, wenn die Zelldichte ungefähr  $10^9$  Zel-



**ABBILDUNG 3-3** Wachstumskurve von *E. coli* bei 37° C. Die graue Linie zeigt den Anstieg der Zellzahl nachdem ein steriles Medium, reich an Nährstoffen (Glucose, Salze, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine) mit  $10^5$  Zellen einer *E. coli*-Kultur im exponentiellen Wachstum versetzt wurde. Wenn die Wachstumskurve stattdessen mit Zellen aus einer langsam wachsenden, fast gesättigten Kultur begonnen worden wäre, hätte die Zellzahl nicht sofort zugenommen; eine Verzögerung von ungefähr einer Stunde wäre dem exponentiellen Wachstum vorausgegangen (farbige Kurve).

len/ml erreicht. Die Zellen, die jetzt noch gebildet werden, sind häufig kürzer. Bei Zelldichten von  $5 \times 10^9$ /ml hört das Zellwachstum schließlich ganz auf. Die Gründe dafür sind nährstoffbedingt, aber noch ungeklärt. Der Ausdruck Wachstumskurve bezeichnet häufig die Zunahme der Zellzahl als Funktion der Zeit.

In den meisten im Wachstum begriffenen Bakterienkulturen variiert die genaue Generationszeit. Auch wenn eine Kultur mit einer einzigen Zelle begonnen wurde, kann man daher nach einigen Generationen zu jedem Zeitpunkt Zellen finden, die sich in verschiedenen Stadien des Wachstumszyklus befinden. Man bezeichnet diese Art als «nicht synchrones Wachstum». Während der letzten 10 Jahre wurden verschiedene Tricks entwickelt, um Bakterienzellen im gleichen Stadium des Zellzyklus zu isolieren. Man kann so über mehrere Generationen hinweg synchronisiertes Zellwachstum erreichen (Abbildung 3-4). Durch kleine Unterschiede in der Generationszeit gehen aber die synchronisierten Wachstumskurven wieder in unsynchronisierte über. Während des exponentiellen Wachstums enthält jede Zelle zwei

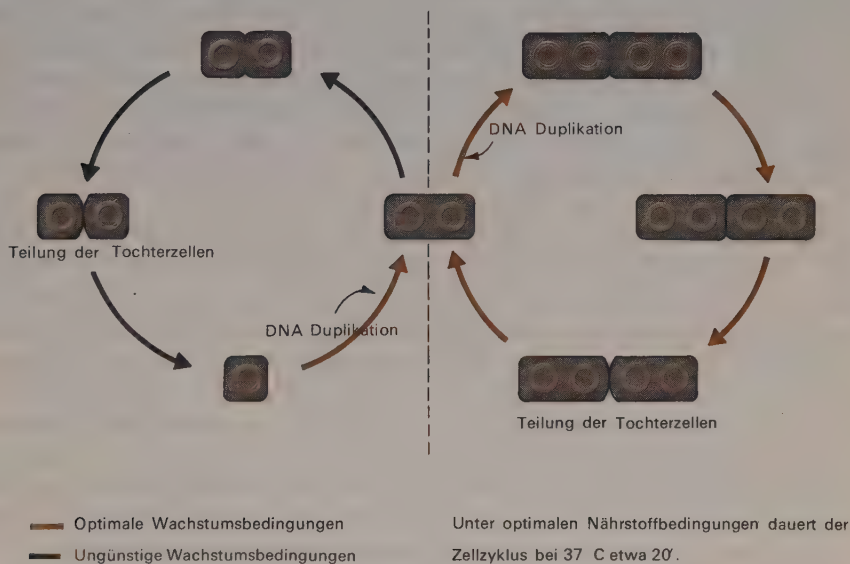


**ABBILDUNG 3-4** Die Wachstumskurve (farbig) einer synchronisierten *E. coli*-Kultur, die auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle wächst. Die graue Linie zeigt den Anstieg der Zellzahl einer nicht synchronisierten Kultur. Im angeführten Beispiel läßt der Grad der Synchronisation in dem 2. und 3. Zellzyklus merklich nach.



oder vier Chromosomen. Alle diese Chromosomen haben die gleiche genetische Zusammensetzung, da sie alle Nachkommen der gleichen parentalen Chromosomen sind. Es ist nicht bekannt, warum jede gesunde Zelle mehrere identische Chromosomen enthält.

Dies ist kein wesentliches Kennzeichen des Lebenszyklus von *E. coli* Zellen, da unter schlechten Nahrungsbedingungen die Chromosomenverdopplung manchmal hinter der Zellteilung nachhinkt (Abbildung 3-5), wobei lebensfähige Zellen entstehen, die nur ein Chromosom enthalten.



**ABBILDUNG 3-5** Der Lebenszyklus von *E. coli* Zellen. Unter optimalen Wachstumsbedingungen enthält die durchschnittliche Zelle 2 bis 4 Chromosomen, je nach dem jeweiligen Stadium im Teilungszyklus. Alle diese Chromosomen sind Nachkommen desselben Elternchromosoms und sind daher genetisch identisch.

Wie bei den meisten, wenn nicht allen Bakterien, ist auch bei *E. coli* das Chromosom nicht von einer Kernmembran umgeben. Es gibt keine strukturelle Unterscheidung zwischen dem Kern und dem Zytoplasma. Bakterienzytologen bezeichnen trotzdem häufig die Region, in der die Chromosomen lokalisiert sind, als Kernregion. Dieser Ausdruck ist jedoch fehl am Platz. Es ist noch immer völlig unklar, was zur Trennung der Chromosomen während der Zellteilung führt. Selbst unter dem Elektronenmikroskop wurde kein Hinweis auf eine Region, die der Spindel entsprechen würde, gefunden.

Das könnte als Hinweis dafür gelten, daß die Spindel eine ganz spezielle

Struktur ist, die sich zu dem Zeitpunkt der Evolution entwickelte, als sich nukleare und zytoplasmatische Regionen differenzierten. Die einzig wesentliche Parallele zwischen der mitotischen Teilung bei höheren Organismen und Bakterien ist daher die, daß in beiden Fällen die identische Duplikation und Trennung der Chromosomen unumgänglich notwendig ist.

Viele Jahre hindurch glaubte man, daß bei Bakterien, einschließlich *E. coli*, keine geschlechtlichen Vorgänge unter Verschmelzung von Zellen auftraten. Seit 1947 weiß man jedoch, daß es männliche und weibliche Zellen gibt und daß es, allerdings nur ganz selten, zu Zellverschmelzungen unter Bildung diploider Zellen kommt. (Nähere Details in Kapitel 7). Diese diploiden Zellen bestehen meistens nur kurze Zeit und bilden innerhalb eines oder zweier Teilungszyklen haploide Zellen. Wie bei der bakteriellen Mitose hat man auch hier keine Hinweise auf den Mechanismus der Chromosomentrennung, welche ja der Reduktion der Chromosomenzahl zurück auf den haploiden Zustand zugrunde liegen muß.

#### AUCH KLEINE ZELLEN HABEN EINE KOMPLEXE STRUKTUR

Sogar so kleine Zellen wie *E. coli* bieten große Schwierigkeiten, sobald man sie auf molekularer Ebene untersuchen will. Auf den ersten Blick muß einem aufrichtigen Chemiker die Aufgabe, die wesentlichen Eigenarten von *E. coli* bald oder je zu verstehen, unüberwindlich erscheinen. Es ist offensichtlich, daß, chemisch gesehen, sogar die kleinste Zelle für ein Studium auf molekularer Ebene viel zu groß ist. Obwohl die *E. coli* Zelle ungefähr 500 mal kleiner ist als die durchschnittlichen Zellen höherer Pflanzen oder Tiere, (die einen Durchmesser von ca.  $10\ \mu$  haben) wiegt sie doch  $2 \times 10^{-12}$  Gramm (MG ca.  $10^{12}$  Dalton, ein Dalton hat das Molekulargewicht 1). Die Zahl mag auf den ersten Blick sehr klein erscheinen, ist jedoch für einen Chemiker enorm: Sie ist um einen Faktor von ca.  $6 \times 10^{10}$  größer als das Gewicht eines Wassermoleküls (MG = 18). Außerdem spiegelt diese große Masse auch eine äußerst komplexe Anordnung einer großen Anzahl verschiedener kohlenstoffhaltiger Moleküle wider.

Es scheint auch eine unendliche Vielfalt in der chemischen Natur dieser Moleküle zu geben. Glücklicherweise ist es aber möglich, die meisten Moleküle nach ihrer Masse verschiedenen, wohl definierten Klassen zuzuschreiben, die die gleiche Anordnung bestimmter Atome besitzen. Zu diesen Klassen gehören die Kohlenhydrate, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren (Tabelle 3-2). Viele Moleküle enthalten gleichzeitig mehrere chemische Gruppen aus verschiedenen Klassen: die Einteilung dieser Moleküle ist daher etwas willkürlich. Außerdem findet man in der Zelle auch viele kleinere Moleküle, wie Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Nukleotide, verschiedene Coenzyme, sehr kleine Moleküle wie  $O_2$  und  $CO_2$  und viele elektrisch gela-

dene anorganische Ionen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  etc.). Schließlich ist auch noch Wasser enthalten, der häufigste Zellbestandteil überhaupt. Es dient als Lösungsmittel für die meisten biologischen Moleküle und ermöglicht rasche Diffusion von einem Ort der Zelle zu einem anderen.

Einen Blick auf die Organisation einer *E. coli* Zelle ist in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines sehr dünnen Schnittes durch eine rasch wachsende Zelle (Abbildung 3-6) wiedergegeben. Außen sieht man die starre Zellwand, ungefähr 100 Å dick, eine mosaikartige Struktur aus Proteinen, Polysacchariden und Lipiden. Unmittelbar nach innen schließt an die Zellwand eine 100 Å dicke, flexible Zellmembran an, die hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden besteht. Diese Membran ist semipermeabel und kontrolliert, welche Moleküle in die Zelle eindringen oder sie verlassen. Ihre Fähigkeit, einen Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten ist von lebensnotwendiger Bedeutung, da die meisten Moleküle, klein oder gross, innerhalb der Zellmembran in wesentlich höheren Konzentrationen auftreten als außerhalb. Das gilt sowohl für anorganische Ionen (z.B.  $\text{K}^+$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ ) als auch für wichtige organische Moleküle. Die Membran muß Moleküle aktiv daran hindern, in die äußere Umgebung viel geringerer Konzentration zu diffundieren.

Abbildung 3-7 zeigt eine schematische Darstellung einer typischen *E. coli* Zelle. Ungefähr ein Fünftel des Zellinneren wird von Desoxyribonukleinsäure eingenommen (DNA), der Verbindung, die für die Übertragung der genetischen Information von einer Zelle zur anderen verantwortlich ist. In der nächsten Umgebung der DNA findet man 20.000 bis 30.000 sphärische Teilchen, 200 Å dick, die sogenannten Ribosomen, die meistens in Aggregaten, die man Polyribosomen nennt, vorkommen. An ihnen läuft die zelluläre Proteinsynthese ab; sie enthalten ca. 40 % Protein und ca. 60 % Ribonukleinsäure (RNA). Der Rest der Zelle ist von Wasser, wasserlöslichen Enzymen und einer Vielzahl verschiedener kleiner Moleküle ausgefüllt.

Wir können zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur ungefähr abschätzen, wie viele chemisch verschiedene Moleküle es innerhalb einer *E. coli* Zelle gibt. Jedes Jahr werden viele neue Moleküle entdeckt. Nach bester Schätzung sind zwischen 3.000 und 6.000 verschiedene Molekülarten vorhanden (Abbildung 3-3). Manche davon, wie  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$  sind chemisch einfach aufgebaut. Andere, wie der häufig vorkommende Zucker Glucose und das stickstoffhaltige Purin Adenin, sind zwar etwas komplexer, können aber mit den üblichen chemischen Methoden relativ leicht untersucht werden.

Andere Zellmoleküle, besonders die Proteine und Nukleinsäuren, sind sehr groß und auch heute ist die Aufklärung ihrer chemischen Struktur mit den größten Schwierigkeiten verbunden. Die meisten dieser Makromoleküle werden überhaupt nicht intensiv untersucht, da ihre ungeheure Komplexität die Chemiker dazu zwingt, sich auf relativ wenige von ihnen zu be-

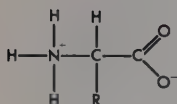
TABELLE 3-2. Die wichtigsten Klassen biologischer Moleküle.

	Allgemeine Beschreibung	Funktion
Proteine	Moleküle, die C, H, O, N und manchmal S enthalten und aus Aminosäuren aufgebaut sind.	Die meisten Proteine sind Enzyme; einige, die meist in sehr großer Zahl in Zellen vorhanden sind, werden für den Aufbau lebensnotwendiger Strukturen wie Zellwand, Zellmembran, Ribosomen, Muskelfasern, Nerven, etc., gebraucht.
Lipide	Wasserunlösliche Moleküle, die manchmal aus Glycerin und drei langkettigen Fettsäuren aufgebaut sind (Triglyceride). In manchen Fällen ist eine Fettsäure durch Cholin ersetzt (Lecithine), in anderen Glycerin durch Sphingosin. Viele Lipide enthalten außerdem Phosphor (Phospholipide).	Triglyceride sind die hauptsächliche Speicherform energiereicher Nahrung. Sie werden zu Acetyl-CoA abgebaut. Phospholipide sind essentielle Bestandteile aller Membranen. Durch ihre Wasserunlöslichkeit können sie die Permeabilität kontrollieren.
Kohlenhydrate	Moleküle, die C, H und O, meistens im Verhältnis 1:2:1 enthalten; Polysaccharide sind aus einfachen Zuckern (Monosacchariden) wie z.B. Glucose und Galactose, aufgebaut. In einigen Fällen enthalten die Zucker Aminogruppen (z.B. Glucosamin).	Einige, wie z.B. Zellulose und Pektin, werden für den Aufbau widerstandsfähiger, schützender Zellwände verwendet; andere, wie Glykogen, sind die Speicherform der Glucose.
Nukleinsäuren	Lange, lineare Moleküle, die P, C, H, O und N enthalten und aus Pentose (Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen) und Nukleotiden aufgebaut sind.	Es gibt zwei hauptsächliche Klassen von Nukleinsäuren in Zellen: DNA ist das primäre genetische Material aller Zellen; RNA ist gewöhnlich für die Proteinsynthese notwendig. In einigen Viren ist RNA das genetische Material.

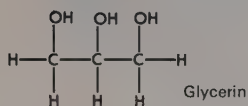


TABELLE 3-2. (fortgesetzt)

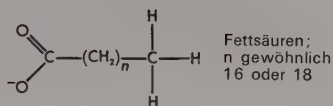
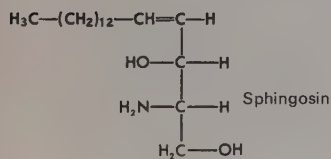
## Bausteine



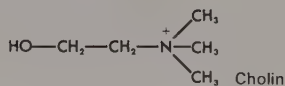
Aminosäure



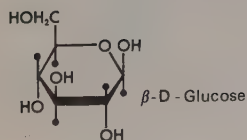
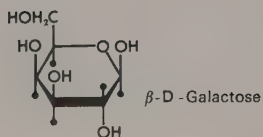
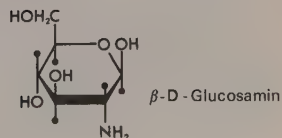
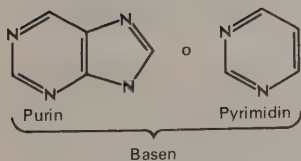
Glycerin

Fettsäuren;  
n gewöhnlich  
16 oder 18

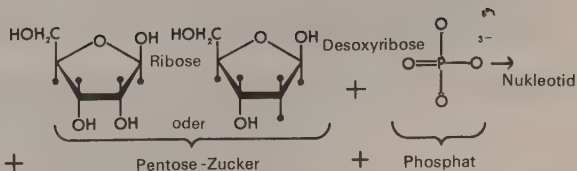
Sphingosin



Cholin

 $\beta$ -D - Glucose $\beta$ -D - Galactose $\beta$ -D - Glucosamin

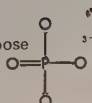
Basen



Ribose

Desoxyribose

Pentose-Zucker

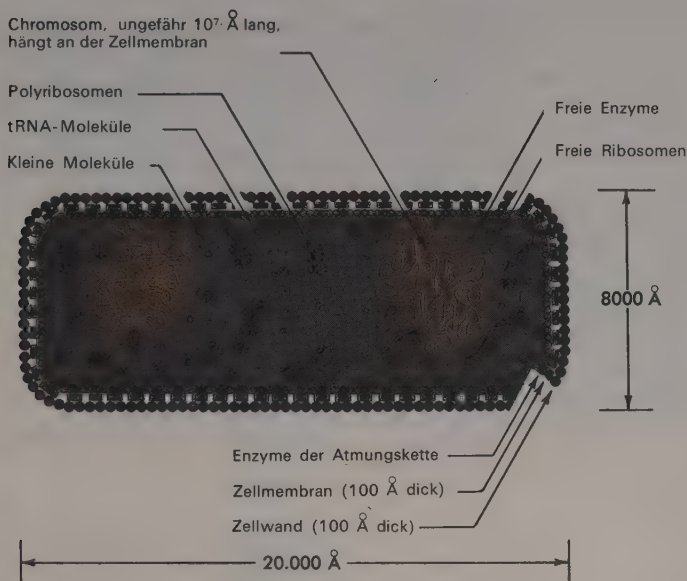


Phosphat

Nukleotid



**ABBILDUNG 3-6** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines sehr dünnen Schnitts durch eine *E. coli* Zelle. 105.000-fache Vergrößerung. Die äußere Membran ist die schützende Zellwand; nach innen schließt die Zellmembran an, die die Permeabilität kontrolliert. Im allgemeinen liegt die Zellmembran eng an der Zellwand; hier wird zu Illustrationszwecken eine zufällige Situation gezeigt, in der die Membran sich an einigen Stellen von der Zellwand gelöst hat (von E. Kellenberger zur Verfügung gestellt; genehmigte Reproduktion.)



**ABBILDUNG 3-7** Schematische Darstellung einer *E. coli* Zelle mit zwei identischen Chromosomen.

schränken. Man muß daher von vorneherein zugeben, daß man die Struktur einer Zelle nie so gut verstehen wird wie die von Wasser oder Glucosemolekülen. Nicht nur wird die detaillierte Struktur der meisten Makromoleküle unbekannt bleiben, sondern auch ihre relativen Positionen innerhalb der Zellen werden nur vage bekannt sein.

Es ist daher nicht überraschend, daß viele Chemiker nach kurzen Perioden der Begeisterung für das Studium des «Lebens» sich wieder still der Welt der reinen Chemie zuwenden. Andere werden jedoch optimistischer, sobald sie erkennen, daß 1) alle Makromoleküle Polymere sind, die aus kleinen monomeren Untereinheiten aufgebaut sind, daß es 2) in Zellen wohl definierte, hintereinander ablaufende chemische Reaktionen gibt (Stoffwechselwege) und daß es 3) nur eine begrenzte Zahl von Enzymen (und damit auch an kleinen Molekülen) in einer Zelle geben kann, da diese nur eine begrenzte Menge an DNA enthält.

### MAKROMOLEKÜLE, DIE DURCH LINEARE VERKNÜPFUNG KLEINER MOLEKÜLE AUFGEBAUT SIND

Ein Großteil der Zellmasse von *E. coli* (mit Ausnahme von Wasser) besteht, wie bei anderen Zellen, aus Makromolekülen. Die meisten dieser großen Moleküle sind Proteine, von welchen ca. die Hälfte Enzymfunktion haben.

**TABELLE 3-3.** *Ungefähre chemische Zusammensetzung einer sich rasch teilenden Escherichia coli-Zelle<sup>a</sup>*

Verbindung	Prozent des gesamten Zellgewichts	Durchschnittliches MG	Durchschnittliche Anzahl pro Zelle	Anzahl verschiedener Arten
H <sub>2</sub> O	70	18	$4 \times 10^{10}$	1
Anorganische Ionen (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , etc.)	1	40	$2,5 \times 10^8$	20
Kohlenhydrate und Vorstufen	3	150	$2 \times 10^8$	200
Aminosäuren und Vorstufen	0,4	120	$3 \times 10^7$	100
Nukleotide und Vorstufen	0,4	300	$1,2 \times 10^7$	200
Lipide und Vorstufen	2	750	$2,5 \times 10^7$	50
Andere kleine Moleküle (Häm, Quinone, Abbauprodukte von Nahrungsmittelmolekülen, etc.)	0,2	150	$1,5 \times 10^7$	200
Proteine	15	40.000	$10^6$	2000 bis 3000
Nukleinsäuren				
DNA	1	$2,5 \times 10^9$	4	1
RNA	6			
16s rRNA		500.000	$3 \times 10^4$	1
23s rRNA		1.000.000	$3 \times 10^4$	1
tRNA		25.000	$4 \times 10^5$	40
mRNA		1.000.000	$10^3$	1000

<sup>a</sup> Gewicht  $10^{12}$  Dalton

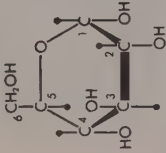
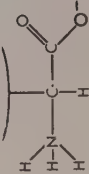
Die restlichen Proteine werden für den Aufbau der Ribosomen, der Zellwand etc. verwendet. Tabelle 3-3 zeigt, daß die Zahl der Atome in einem Makromolekül 25 bis 50 Mal größer ist als in kleinen Molekülen. Man könnte daher zunächst annehmen, daß die meisten Biochemiker, die auf synthetischem Gebiet arbeiten, sich unmittelbar mit der unerhört komplizierten Aufgabe beschäftigen würden, das Wachsen großer Moleküle durch Aneinanderfügen von Atom an Atom zu verstehen. Außerdem könnte man vermuten, daß ihre verhältnismäßig ungeheuer große einen sehr langsamen Fortschritt der Forschung bedingen würde. Glücklicherweise macht aber das Auftreten dreier vereinfachender Strukturprinzipien das Problem zu einem zwar schwierigen, aber nicht unlösbaren.

Erstens sind alle Makromoleküle Polymere, die durch Kondensation kleiner Moleküle entstehen. Die Biosynthese von Makromolekülen verläuft daher in zwei Stufen, 1) der Synthese kleinerer Moleküle und 2) der systematischen Verknüpfung dieser Untereinheiten. Man kann sie vielleicht mit dem Bau eines Hauses aus Fertigteilen vergleichen.

Zweitens haben die Untereinheiten eines bestimmten Makromoleküls gemeinsame chemische Gruppierungen, wie in Tabelle 3-4 gezeigt wird, die die wichtigsten Strukturmerkmale einiger bedeutender Makromoleküle angibt. So werden z.B. Proteine durch Kondensation stickstoffhaltiger organischer Moleküle, den sogenannten Aminosäuren, aufgebaut. Die chemische



TABELLE 3-4. Strukturelle Organisation einiger wichtiger biologischer Makromoleküle.

Makromoleküle	Monomere Untereinheit	Anzahl verschiedener Monomeren	Allgemeine Formel des Monomeren	Festgelegte oder varierende Kettenlänge	Bindung zwischen den Monomeren
Glykogen (ein Polysaccharid)	Glucose	Eins		Unbegrenzt — kann > 1000 sein	<p>1-4-glycosidische Bindung</p> $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ <p>3'-5'-Phosphodiesterbindung</p> $\begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \\   \quad \quad \quad    \quad \quad \quad   \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{---} \end{array}$
DNA (Desoxyribonukleinsäure)	Desoxynukleotide	Vier: Desoxyadenylat Desoxyguanylat Desoxythymidylat Desoxycytidylat	Purin-desoxyribose-P (oder Pyrimidin-desoxyribose-P)	Genetisch festgelegt; kann > 10 <sup>7</sup> sein	<p>3'-5'-Phosphodiesterbindung</p> $\begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \\   \quad \quad \quad    \quad \quad \quad   \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{---} \end{array}$
RNA (Ribonukleinsäure)	Ribonukleotide	Vier: Adenylat Guanylat Uridylat Cytidylat	Purin-ribose-P (oder Pyrimidin-ribose-P)	Genetisch festgelegt, häufig > 3000	<p>3'-5'-Phosphodiesterbindung</p> $\begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{P} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---} \\   \quad \quad \quad    \quad \quad \quad   \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{---} \end{array}$
Protein	L-Aminosäuren	Zwanzig: Glycin, Alanin, Serin etc.	Seitenkette 	Genetisch festgelegt, variiert im allgemeinen zwischen 100 und 1000	<p>Peptidbindung</p> $\text{H} - \text{N} - \text{C} = \text{O}$

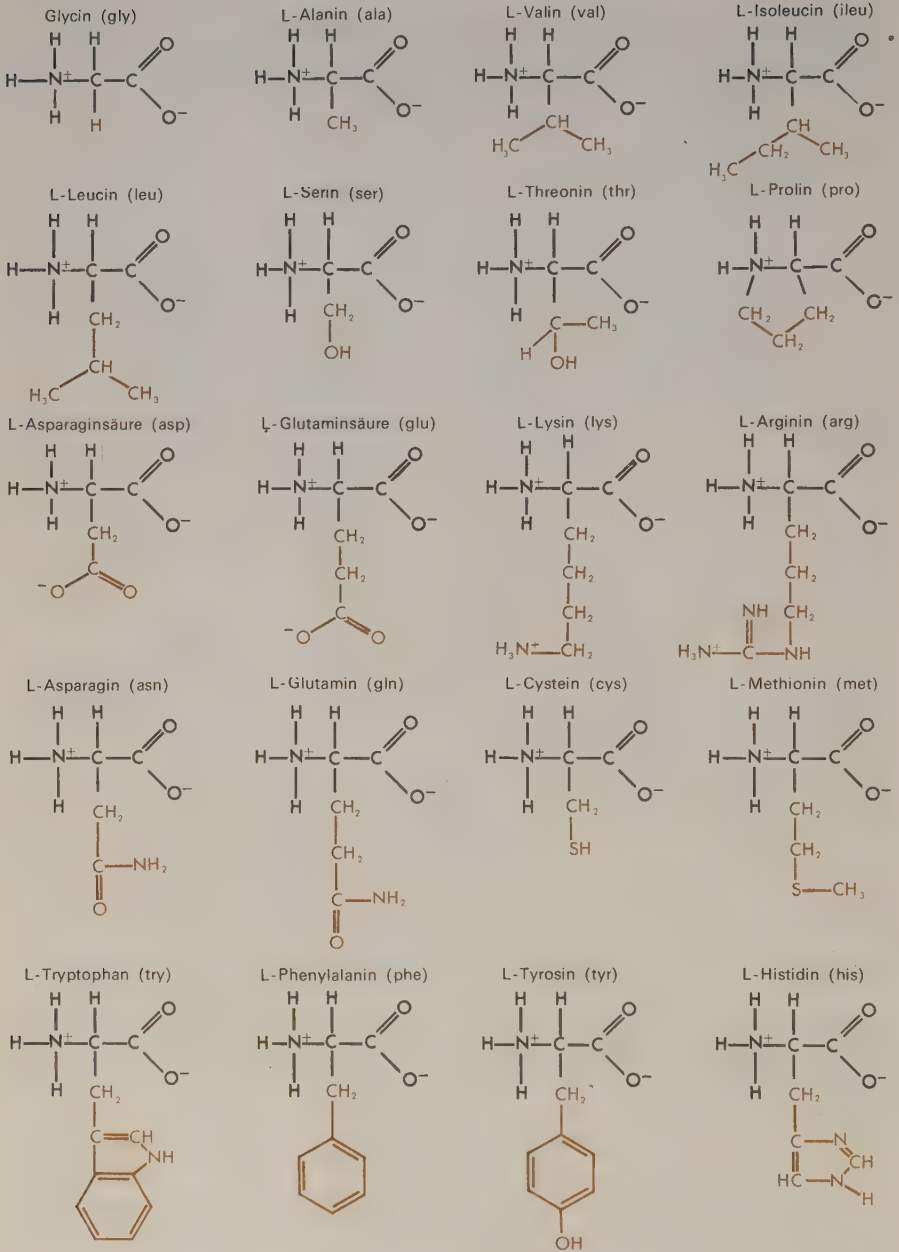


ABBILDUNG 3-8 Die zwanzig üblichen Aminosäuren, die man in Proteinen findet.

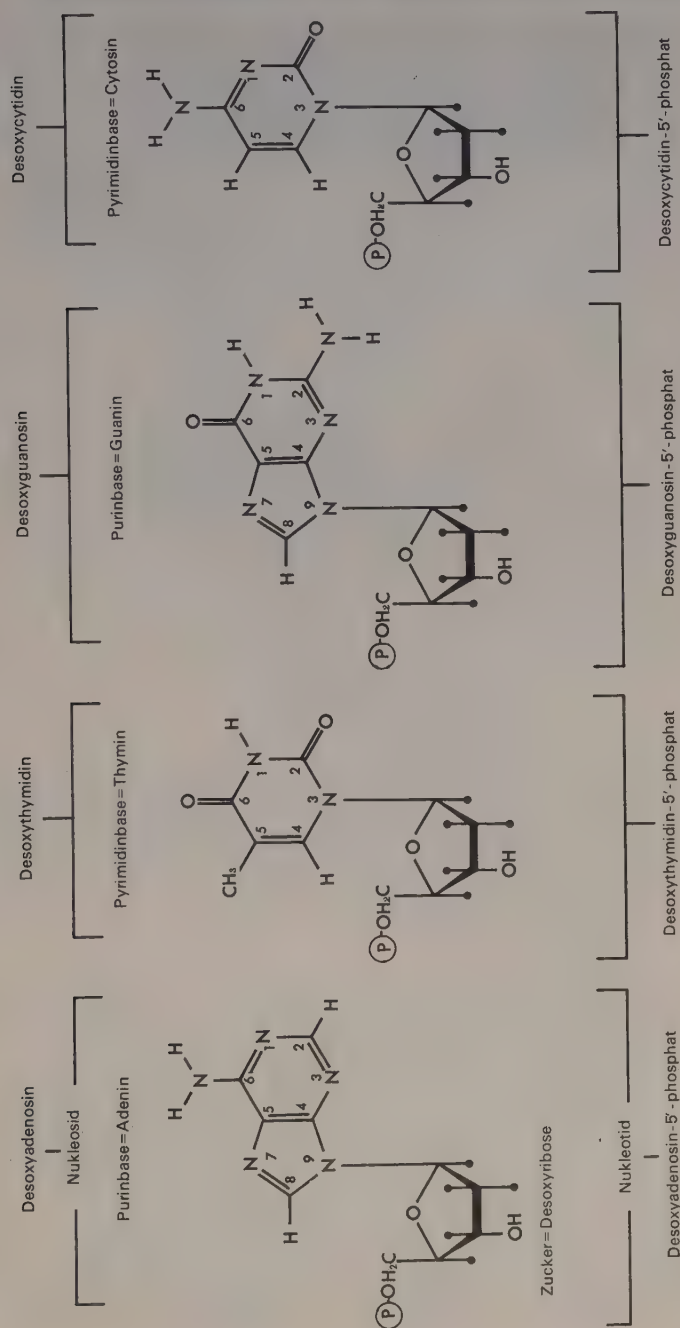
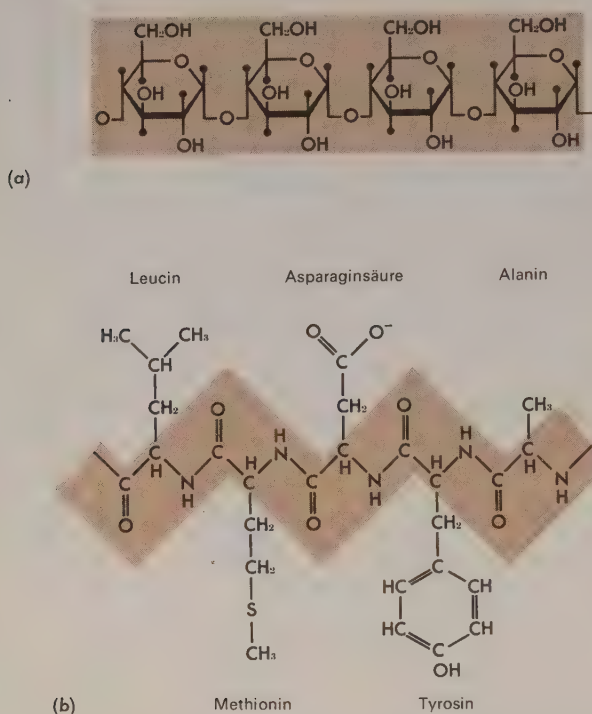


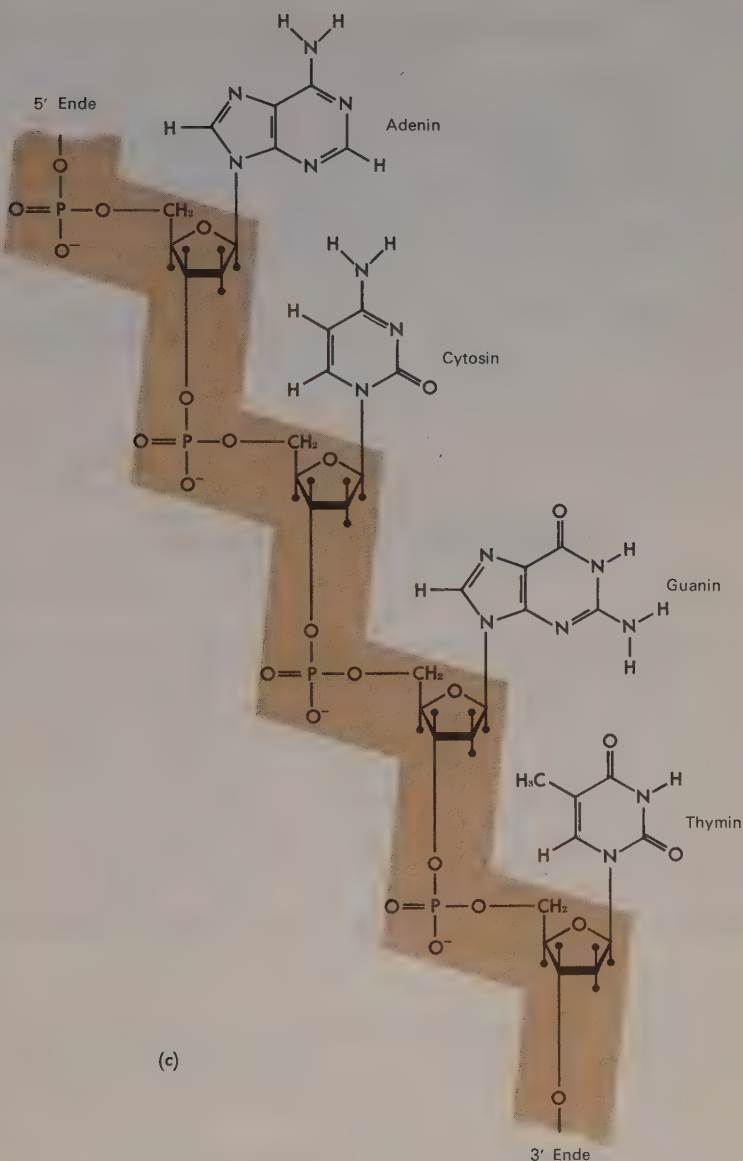
ABBILDUNG 3-9 Die hauptsächlichsten Nukleotidbausteine der DNA.



**ABBILDUNG 3-10** Die Struktur einiger biologischer Makromoleküle. Das Skelett ist farbig dargestellt. a) Die Struktur eines Abschnitts einer Glykogenkette, die aus Glucoseuntereinheiten aufgebaut ist. b) Abschnitt der Polypeptidkette eines Proteins. Die Untereinheiten der Aminosäure von links nach rechts sind: Leucin, Methionin, Asparaginsäure, Tyrosin und Alanin. c) Abschnitt der Polynukleotidkette einer Desoxyribonukleinsäure.

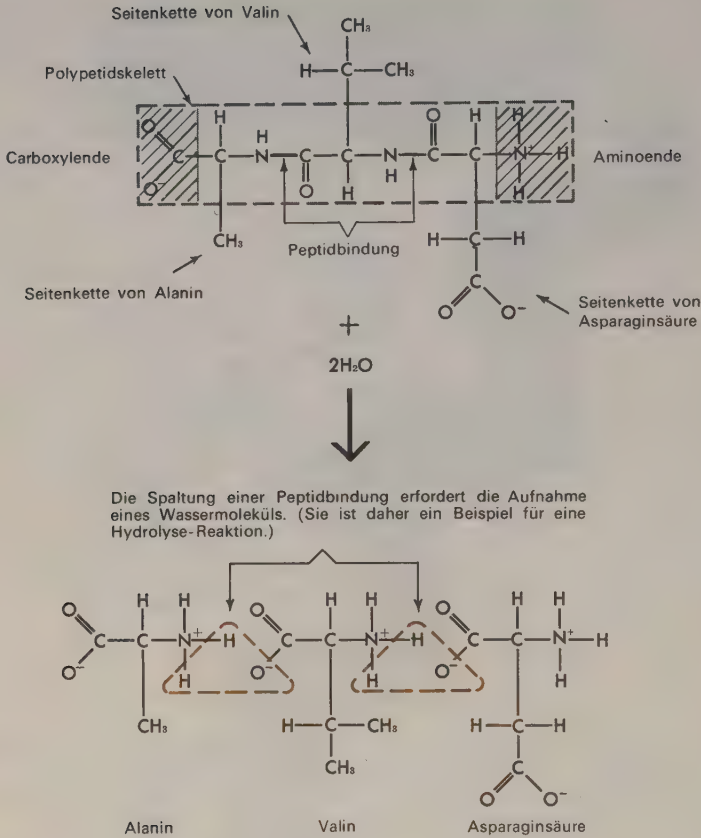
Bindung, die die zwei Aminosäuren zusammenhält, ist die Peptidbindung. Es gibt zwanzig wichtige Aminosäuren; jede von ihnen hat einen Teil ihrer Struktur mit allen übrigen Aminosäuren gemein. An dieser gemeinsamen Region hängt eine «Seitenkette», die für jede Aminosäure spezifisch ist (Abbildung 3-8). Jede Aminosäure besteht somit aus einer *spezifischen* Region (der Seitenkette) und einer *nicht spezifischen* Region. Die Nukleinsäuren, DNA und RNA, werden ebenfalls durch Vereinigung kleinerer Moleküle, der sogenannten Nukleotide, gebildet. Die Nukleotide der RNA werden, da sie den Zucker Ribose enthalten, Ribonukleotide genannt, die der DNA, die statt dessen Desoxyribose enthalten, heißen Desoxyribonukleotide (Abbildung 3-9, weitere Details in Kapitel 9). Die Nukleotide sind immer über





eine Phosphatgruppe und eine Hydroxylgruppe der Zuckerkomponente verknüpft. (Abbildung 3-4).

Diese Bindungen werden daher Phosphodiesterbindungen genannt. Jedes Nukleotid, sowie jede Aminosäure, enthält sowohl eine spezifische als auch



**ABBILDUNG 3-11** Hydrolyse einer Polypeptidkette zu Aminosäuren. Wir zeigen hier ein einfaches Polypeptid, das nur drei Aminosäuren enthält.

eine unspezifische Region. Phosphat und Zuckerkomponente stellen den unspezifischen Teil eines Nukleotids dar, wogegen Purin- und Pyrimidinbasen den spezifischen bilden. DNA und RNA enthalten jeweils 4 hauptsächliche Basen: zwei Purine und zwei Pyrimidine.

Drittens sind die meisten Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine und einige Polysaccharide) *lineare* Aggregate, bei denen die Untereinheiten über chemische Bindungen zwischen Atomen der nicht spezifischen Region verknüpft sind. Die lineare Struktur folgt aus der Tatsache, daß die meisten Untereinheiten nur zwei funktionelle Gruppen enthalten, die mit anderen Untereinheiten reagieren können. Ein Großteil der Makromoleküle be-

steht daher aus einer immer wiederkehrenden Reihe identischer chemischer Gruppen (dem Skelett, Abbildung 3-10).

Eine allen diesen biologischen Polymeren gemeinsame Eigenart ist die, daß die einzelnen Untereinheiten im Polymerverband jeweils zwei Wasserstoffatome und ein Sauerstoffatom weniger enthalten als die Monomeren, aus denen sie entstehen. Bei der Synthese wird also Wasser abgespalten. Wenn die Polymeren zu kleineren Untereinheiten abgebaut werden, wird z.B. pro gespaltenen Peptidbindung ein Molekül Wasser angelagert (Abbildung 3-11).

Abbaureaktionen, die unter Wasseraufnahme erfolgen, werden als hydrolytische Reaktionen bezeichnet. Es gibt viele verschiedene Arten hydrolytischer Reaktionen, da zahlreiche kleine Moleküle unter Wasseraufnahme zu noch kleineren Einheiten abgebaut werden können. Unter normalen Zellverhältnissen ist die Hydrolyse der wichtigen Polymeren oder der kleineren Moleküle sehr selten. Sie wird jedoch durch die Anwesenheit spezifischer Enzyme beschleunigt. So katalysieren z.B. die Enzyme Pepsin und Trypsin spezifisch den hydrolytischen Abbau von Proteinen.

#### UNTERSCHIEDUNG ZWISCHEN REGELMÄSSIGEN UND UNREGELMÄSSIGEN POLYMEREN

Tabelle 3-4 zeigt ebenfalls einen wichtigen Unterschied zwischen Polysacchariden wie z.B. Glykogen und den Proteinen und Nukleinsäuren. Polysaccharide sind gewöhnlich durch regelmäßige (oder halbregelmäßige) Aneinanderreihung einer oder zweier verschiedener Arten von Monosacchariden aufgebaut. Im Gegensatz dazu enthalten die Proteine 20 verschiedene Aminosäuren und die Nukleinsäuren vier verschiedene Nukleotide. Dazu kommt noch, daß in den Nukleinsäuren und Proteinen die Reihenfolge der Untereinheiten höchst unregelmäßig ist und von einem spezifischen Molekül zum anderen stark variiert. Beim Aufbau von Polysacchariden aus Monosacchariden muß im allgemeinen nur immer wieder die gleiche Bindung im Skelett geknüpft werden.

Bei der Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen ist zusätzlich ein höchst wirkungsvoller Mechanismus erforderlich, der die richtigen Untereinheiten auswählt und sie ordnet.

#### STOFFWECHSELWEGE

Wenn wir das Bakterium *E. coli* auf einem einfachen, eindeutig definierten Nährmedium, das nur den Zucker Glucose enthält (Tabelle 3-1) wachsen lassen, können wir direkt beobachten, daß alle Moleküle in einer Zelle durch zelluläre Umwandlung von Nährstoffmolekülen entstehen. Unter diesen Bedingungen ist Glucose die einzige organische Kohlenstoffquelle.

Tatsächlich müssen alle Kohlenstoffatome in *E. coli*-Molekülen (oder fast alle, da einige aus  $\text{CO}_2$  stammen) durch chemische Umwandlung aus der Glucose stammen. Dabei kann Glucose entweder zu kleineren Bruchstücken abgebaut werden oder es können durch Verknüpfung größere Moleküle, wie die Nukleotide oder Glykogen entstehen. Der genaue Ablauf dieser Umwandlungen (die man zusammenfassend Intermediärstoffwechsel nennt) ist äußerst komplex und die meisten Biochemiker beschränken sich auf das Studium (oder die bloße Kenntnis!) nur weniger dieser Vorgänge.

Glücklicherweise beginnen einige allgemeine Grundzüge der Stoffwechselvorgänge sich abzuzeichnen. Abbildung 3-12 zeigt einige der wichtigeren chemischen Vorgänge, die nach Aufnahme von Glucose in der *E. coli* Zelle ablaufen. Ein Großteil dieser Information wurde dadurch gewonnen, daß man *E. coli* auf spezifisch mit radioaktiven Isotopen markierten Molekülen wachsen ließ. Wenn man z.B. *E. coli* wenige Sekunden lang (für einen Puls) mit  $^{14}\text{C}$ -Glucose füttert, kann die Radioaktivität fast unmittelbar nachher in Molekülen, die chemisch mit Glucose verwandt sind (z.B. Glucose-6-phosphat), nachgewiesen werden. Erst nach einiger Zeit findet man die markierten Atome in den verschiedenen Aminosäuren und Nukleotiden. Die Zeitspanne, die verstreicht, bis Radioaktivität in den verschiedenen Verbindungen auftritt, stimmt in groben Umrissen mit der Anzahl der biologischen Reaktionen, die Glucose von den verschiedenen Stoffwechselprodukten trennt, überein.

Aus Abbildung 3-12 können wir ersehen, daß verschiedene Zwischenstufen des Glucoseabbaus eine Schlüsselstelle einnehmen und auf mehrere verschiedene Arten weiter reagieren können. Sie können entweder über das Embden-Meyerhof Schema, den Krebs-Zyklus oder die Atmungskette vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut werden.

Dabei wird ADP in ATP umgewandelt. Andererseits können verschiedene Zwischenstufen als Ausgangsmaterial für weitere chemische Schritte verwendet werden, die mit der Synthese lebensnotwendiger Moleküle wie Aminosäuren oder Nukleotiden enden. So wird z.B. Dihydroxyaceton- $\text{P}$  als Vorstufe für den Lipidbaustein Glycerin verwendet, wogegen 3-Phosphoglycerinsäure als Ausgangsprodukt für eine Reihe von Reaktionen dient, in deren Verlauf die Aminosäuren Serin, Glycin und Cystein gebildet werden.

Zusammengehörige biosynthetische (abbauende) Reaktionen werden Stoffwechselwege genannt. Wenn ein Molekül einmal in eine dieser Reaktionsfolgen eingeschleust wurde, muß es meist eine Reihe von schrittweisen Umwandlungen mitmachen. Aber nicht alle diese Reaktionsfolgen sind notwendigerweise linear. Einige weisen Verzweigungen auf. Zwischenprodukte können an den Verzweigungsstellen in eines von zwei oder mehreren möglichen Produkten umgewandelt werden. Diese Zwischenverbindungen, denen verschiedene Reaktionsmöglichkeiten offenstehen, sind im Stoffwechsel der Zelle von größter Bedeutung. Zu den bekanntesten gehören Glucose-6- $\text{P}$ ,



Brenztraubensäure,  $\alpha$ -Ketoglutarat, und Oxalacetat. Jede dieser Verbindungen dient als Ausgangsprodukt für verschiedene wichtige Stoffwechselwege. Vielleicht eine der bedeutendsten Verbindungen dieser Art ist Acetyl-CoA, das nicht nur die wichtigste Vorstufe für Lipide darstellt, sondern auch die Acetatgruppe enthält, die im Citronensäurezyklus verbraucht wird.

Die meisten Moleküle haben jedoch im Stoffwechsel viel beschränktere Möglichkeiten. Ein Durchschnittsmolekül kann entweder zur Verbindung X abgebaut oder als Vorstufe für die Biosynthese von Y verwendet werden; entsprechend kann ein solches Stoffwechselprodukt nur mit zwei verschiedenen Enzymen spezifisch reagieren.

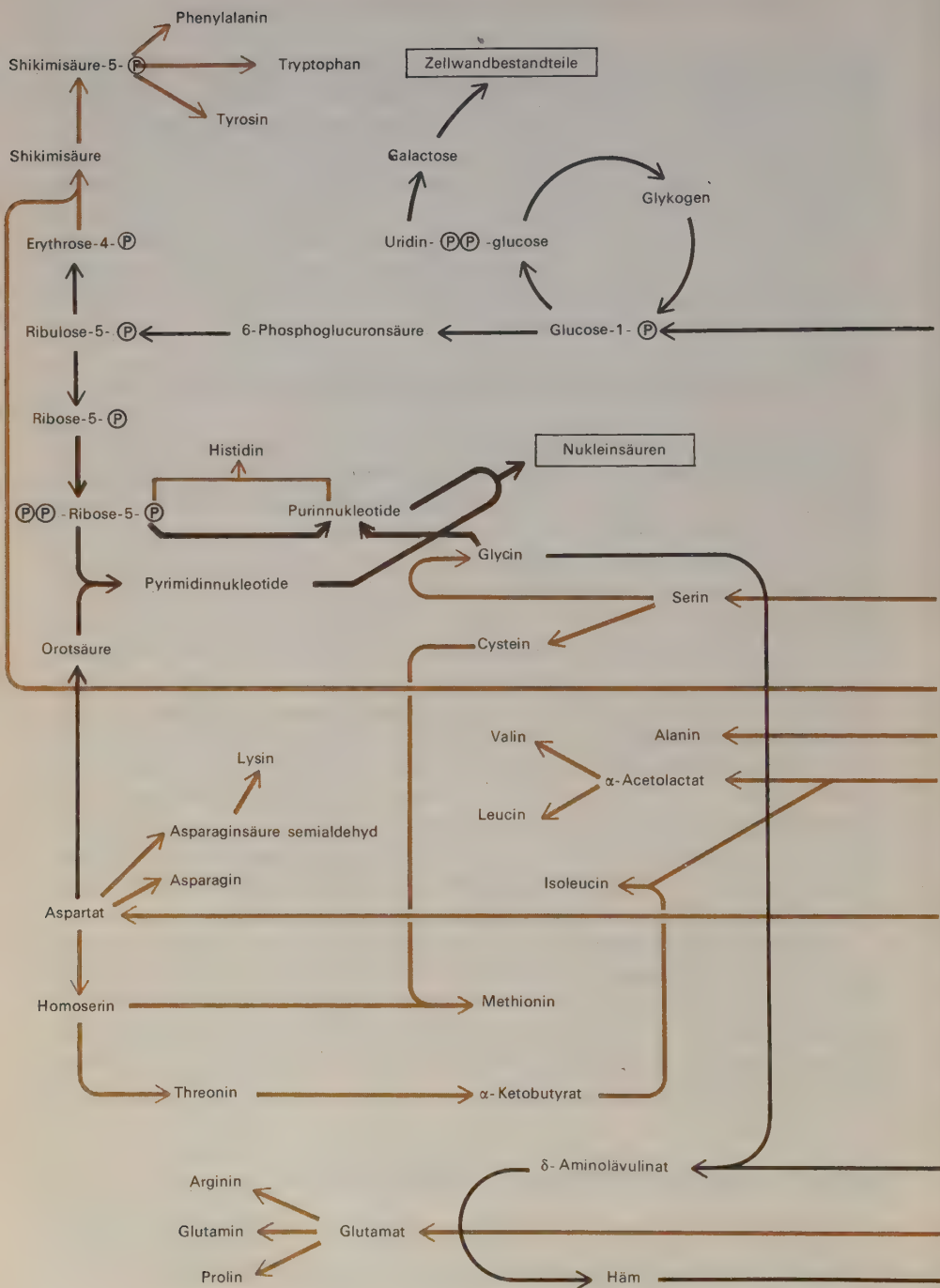
### ABBAUWEGE SIND VON BIOSYNTHESEWEGEN VERSCHIEDEN

Wenn *E. coli* auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle wächst, müssen sämtliche Aminosäuren aus Stoffwechselprodukten der Glucose synthetisiert werden. Es gibt daher einen ganz bestimmten Biosyntheseweg für jede der 20 Aminosäuren (Abbildung 3-12). *E. coli* kann sich aber auch in der Abwesenheit eines Zuckers vermehren, wobei es jede der 20 Aminosäuren als einzige Kohlenstoffquelle verwenden kann. Daraus folgt, daß es auch 20 Abbaupfade für Aminosäuren geben muß, durch die die Kohlenstoff- und Stickstoffatome der Aminosäuren in eine für die Bildung von Schlüsselverbindungen wie  $\alpha$ -Ketoglutarat und Acetyl-CoA verwertbare Form gebracht werden. Diese Verbindungen können dann zur Synthese anderer Aminosäuren herangezogen werden. Solche Abbaupfade gibt es auch für verschiedene Lipide, Purin- und Pyrimidinnukleotide, viele Pentose- und Hexosezucker etc. Die meisten Abbaupfade sind recht spezifisch und man findet daher eine große Zahl (vielleicht 200 bis 300) verschiedener Abbauprodukte in *E. coli*. Diese Zahl muß für viele andere Bakterien noch größer sein, besonders für die Pseudomonaden, da diese eine größere Vielfalt von organischen Molekülen abbauen können als *E. coli*.

Die Beweise häufen sich, daß im allgemeinen die Abbaupfade von den Biosynthesewegen recht verschieden sind. Diese Beobachtung ist nicht überraschend. Wir werden in Kapitel 5 sehen, daß die meisten biochemischen Syntheseschritte Energie und daher häufig ATP verbrauchen, wogegen Abbaureaktionen als grundlegende Aufgabe die Bildung von ATP haben; zusätzlich müssen sie das Kohlenstoff- und Stickstoffgerüst zur Verfügung stellen.

### DIE BEDEUTUNG EINER BEGRENZTEN MENGE VON DNA

Der informierte Chemiker mag Abbildung 3-12 mit einiger anfänglicher Skepsis betrachten. Ihre Einfachheit und Klarheit kann nicht über die Tat-



- Stoffwechselwege für die Aminosäuresynthese
- Stoffwechselwege für die Nukleinsäuresynthese
- - - Stoffwechselwege für die ATP-Synthese
- Stoffwechselwege für die Lipidsynthese

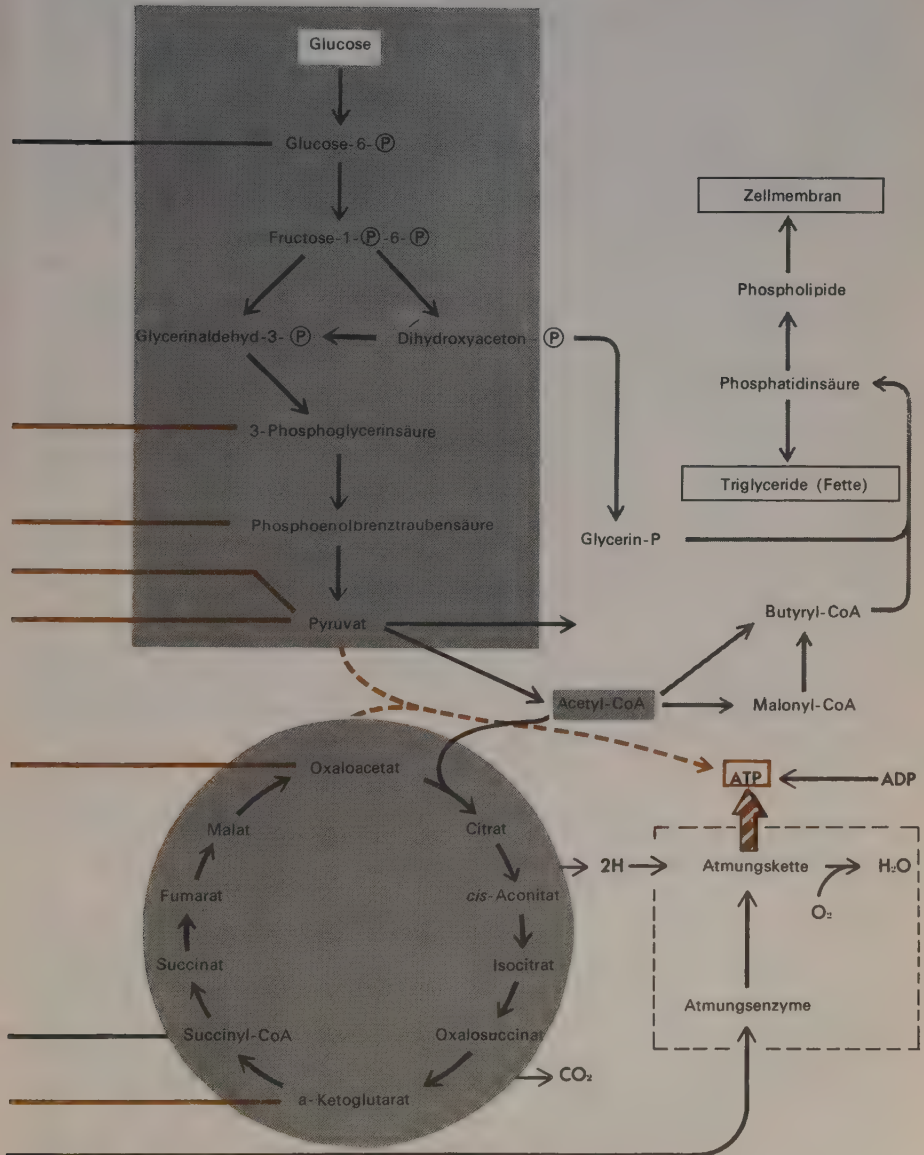


ABBILDUNG 3-12 Schematische Darstellung einiger wichtiger Stoffwechselwege in *E. coli*

sache hinwegtäuschen, daß anscheinend jede Woche über die Entdeckung eines neuen Enzyms und die dazugehörige Stoffwechselreaktion berichtet wird. Es erhebt sich also die Frage, ob Abbildung 3-12, durch ihre Vereinfachung, an den tatsächlichen Stoffwechselvorgängen in *E. coli* vorübergeht. Das wäre sicherlich der Fall, wenn es statt einem oder zwei Abbauwegen für Glucose 50 oder 100 gäbe und wenn ebenso 20 verschiedene Reaktionsfolgen für die Biosynthese jedes der Nukleotide, Aminosäuren etc. möglich wären.

Der häretische Gedanke, daß bis jetzt nur ein unbedeutender Bruchteil aller Stoffwechselvorgänge in *E. coli* beschrieben wurde, kann jedoch auf einfache Weise zurückgewiesen werden. Das Argument beruht auf der Tatsache, die wir in späteren Kapiteln beweisen werden, daß die Nukleotidsequenz in der DNA die genetische Information in sich trägt, die die Reihenfolge der Aminosäuren in den Proteinen bestimmt (codiert). Man weiß heute, daß drei aufeinanderfolgende Nukleotidpaare jeweils eine Aminosäure codieren. Ein Protein durchschnittlicher Größe, das z.B. dreihundert Aminosäuren enthält, erfordert also einen Code von neunhundert Nukleotidpaaren. Da jedes Nukleotidpaar ein MG von ungefähr 660 hat, ist eine DNA vom  $MG \cong (660) (900) = 6 \times 10^5$  für jedes Protein notwendig. Die Zahl verschiedener Proteine kann daher nicht größer sein als die Menge an haploider DNA dividiert durch  $6 \times 10^5$ .

Man kann diese Zahl weiterhin dazu benutzen, die ungefähre Anzahl verschiedener kleiner Moleküle einer Zelle abzuschätzen. Die Mehrzahl aller Proteine einer Zelle sind Enzyme. Jedes von ihnen katalysiert einen ganz bestimmten Stoffwechselschritt. Man kann ungefähr die Zahl der verschiedenen kleinen Moleküle abschätzen, wenn man weiß, wieviele spezifische Enzyme im Durchschnitt für den Stoffwechsel eines beliebigen kleinen Moleküls erforderlich sind. Als eine vernünftige Annahme gilt heute, daß die Zahl zwischen eins und zwei liegt.

#### **EIN FÜNFTEL BIS EIN DRITTEL ALLER CHEMISCHEN REAKTIONEN, DIE IN *E. COLI* ABLAUFEN, SIND BEKANNT**

Unsere beste Schätzung für haploides MG von DNA in *E. coli* ist  $2,5 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$ . Diese Zahl entspricht 2000-3000 Proteinmolekülen durchschnittlicher Größe und läßt vermuten, daß die Zahl kleiner Moleküle bei etwas unter 2000 liegt. Erfreulicherweise finden wir bei Betrachtung der Tabelle 3-3, daß die Zahl kleiner Verbindungen, die an bereits bekannten Stoffwechselvorgängen beteiligt sind, zwischen etwa 600 und 800 liegt. Das bedeutet, daß wir mindestens 1/5 wenn nicht mehr als 1/3 aller Stoffwechselvorgänge, die je für *E. coli* beschrieben werden können, bereits kennen.



Das ist ein befriedigender Schluß, da man daraus annehmen darf, daß wir in den nächsten 10-20 Jahren in der Lage sein werden, praktisch alle Stoffwechselvorgänge, die für das Leben einer *E. coli* Zelle wichtig sind, zu beschreiben.

Es braucht daher auch ein vorsichtiger Chemiker, sofern er richtig informiert ist, eine Bakterienzelle nicht als hoffnungslos komplexes Studienobjekt zu betrachten.

Er könnte sich statt dessen mit einem fast freudigen Enthusiasmus an die Arbeit machen, da es wohl klar ist, daß er im Gegensatz zu seinen Kollegen des 19. Jahrhunderts durchaus die Werkzeuge in der Hand hat, die zur vollständigen Beschreibung der wesentlichen Eigenschaften des Lebens erforderlich sind.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Chemisch gesehen sind sogar die kleinsten Zellen unheimlich kompliziert. Die meisten Wissenschaftler, die sich für die chemischen Grundlagen des Zellwachstums und der Zellteilung interessieren, konzentrieren ihre Aufmerksamkeit heute auf Bakterien, da die Bakterienzellen ungefähr 500 mal kleiner sind als eine durchschnittliche Zelle höherer Pflanzen und Tiere. Das bestuntersuchte Bakterium ist *E. coli*. Es wiegt ungefähr  $2 \times 10^{-12}$  Gramm ( $10^{12}$  Dalton), 75% davon sind Wasser. Die Zahl verschiedener Molekülarten in einer *E. coli* Zelle liegt wahrscheinlich zwischen 3000 und 6000. Ungefähr die Hälfte davon sind niedermolekulare Verbindungen, der Rest Makromoleküle. Die große Zahl verschiedener Makromoleküle bedeutet, daß wir in nächster und möglicherweise auch fernerer Zukunft keine genaue Kenntnis der 3-D-Struktur aller dieser Moleküle, sei es auch der kleinsten Zelle, haben werden.*

*Wir kennen jedoch einige Regeln der Zellchemie, die es uns ermöglichen, das Wachstum einer Zelle zu verstehen ohne genaue Kenntnis der Molekülstruktur aller ihrer Bestandteile zu haben. Wir wissen z.B., daß alle zellulären Makromoleküle Polymere sind, die aus viel kleineren Untereinheiten aufgebaut sind. Proteine sind Polymere, die Aminosäuren als Untereinheiten enthalten; die polymeren Nukleinsäuren entstehen durch Verknüpfung von Nukleotiden. Das Problem wird weiter dadurch vereinfacht, daß die meisten Polymeren, einschließlich aller Proteine und Nukleinsäuren, praktisch linear sind.*

*Andere vereinfachende Regeln betreffen die komplexen Stoffwechselvorgänge. Im allgemeinen können Verbindungen nicht direkt in eine größere Zahl anderer Moleküle umgewandelt werden. Statt dessen stellt jede Verbindung einen Schritt in einer Reaktionsfolge dar, die entweder zum Abbau von Nährstoffmolekülen oder zur Biosynthese notwendiger Zellbausteine, wie z.B. Aminosäuren oder Fettsäuren, führt. Der Zellstoffwechsel ist die Summe all dieser*

Reaktionsfolgen, die untereinander so verbunden sind, daß die Produkte der Abbauewege als Ausgangsstoffe für spezifische Biosynthesewege herangezogen werden können.

Die Komplexität der Stoffwechselvorgänge eines Organismus hängt mit der Menge von genetischer Information (DNA) zusammen, die der Organismus enthält. Die DNA-Menge einer Zelle setzt der Zahl verschiedener Enzyme, die die Zelle synthetisieren kann, eine obere Grenze. *E. coli* besitzt genügend DNA, um die Aminosäuresequenz von 2000-3000 verschiedenen Proteinen zu codieren. Ungefähr 600 verschiedene niedermolekulare Verbindungen wurden bis jetzt in *E. coli* gefunden. Dies kann als Hinweis dafür dienen, daß die bisher bekannten Stoffwechselvorgänge in *E. coli* ungefähr 1/5 bis 1/3 seines Gesamtstoffwechsels ausmachen.

## LITERATUR

- Sistrom, W., *Microbial Life*, 2. Aufl., Holt, Rinehart and Winston, New York, 1969. Eine kurze Einleitung in die Biologie und Chemie der Mikroben (Taschenbuch).
- Stanier, R. Y., M. Doudoroff und E. A. Adelberg, *The Microbial World*, 3. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1970. Eine ausgezeichnete Abhandlung über die Mikrobiologie, die jeder Studienanfänger lesen kann.
- Loewy, A., und P. Siekevitz, *Cell Structure and Function*, 2. Aufl., Holt, Rinehart and Winston, New York, 1969. Die wichtigsten Tatsachen über die Zellphysiologie, mit häufiger Betonung der Probleme vielzelliger Organismen.
- Gunsalus, I. C., und R. Y. Stanier, *The Bacteria: A Treatise on Structure and Function* (5 bändig), Academic, New York, 1960-1964. Eine Reihe von Sammelreferaten und Artikeln über alles, was an Bakterien interessant ist.

# 4

## DIE BEDEUTUNG SCHWACHER CHEMISCHER WECHSEL- WIRKUNGEN

Bisher haben wir unsere Aufmerksamkeit auf die Existenz einzelner organischer Moleküle konzentriert und dabei —den Regeln der klassischen organischen Chemie folgend— die kovalenten Bindungen, die sie zusammenhalten, betont. Es ist aber nicht schwer, einzusehen, daß diese Art der Analyse für die Beschreibung der Zelle nicht ausreicht. Wir müssen uns auch mit der räumlichen Gestalt der Moleküle beschäftigen und mit den verschiedenen Faktoren, die sie zu einem organisierten Ganzen zusammenfügen. Die Anordnung der Moleküle in einer Zelle ist nicht willkürlich und wir müssen uns daher fragen, welche chemischen Gesetze sie bestimmen. Kovalente Bindungen können dafür offensichtlich nicht verantwortlich gemacht werden, da ja definitionsgemäß Atome, die durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind, demselben Molekül angehören.

Die Anordnung der einzelnen Moleküle in einer Zelle wird statt dessen von chemischen Bindungen bestimmt, die wesentlich schwächer sind als kovalente Bindungen. Atome, die durch kovalente Bindungen verknüpft sind, können zusätzlich noch mit benachbarten Atomen schwache Wechselwirkungen eingehen. Diese Wechselwirkungen, die man manchmal als sekundäre Valenzen bezeichnet, treten nicht nur zwischen Atomen verschiedener Moleküle auf, sondern auch zwischen den Atomen desselben Moleküls. Diese schwachen Kräfte, bestimmen nicht nur, welche Moleküle nahe beieinander liegen, sondern sie sind auch teilweise für die Gestalt flexibler

Moleküle wie der Polypeptide und Polynukleotide verantwortlich. Es ist daher notwendig, sich ein Bild dieser schwachen Wechselwirkungen zu machen und zu verstehen, warum ihre spezifischen Eigenschaften sie für die Existenz der Zelle unentbehrlich machen. Zu den wichtigsten gehören van der Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brückenbindungen und ionische Bindungen.

## DEFINITION UND EINIGE EIGENSCHAFTEN CHEMISCHER BINDUNGEN

Eine chemische Bindung stellt Anziehungskräfte dar, die die Atome zusammenhalten. Aggregate definierter Größe werden Moleküle genannt. Man dachte ursprünglich, daß nur kovalente Bindungen Atome in Molekülen zusammenhalten können; wir wissen aber heute, wie wir in diesem Kapitel noch sehen werden, daß schwache Wechselwirkungen für den Zusammenhalt vieler Makromoleküle verantwortlich sind. So werden z.B. die vier Polypeptidketten des Hämoglobins durch das Zusammenwirken mehrerer sekundärer Valenzkräfte miteinander verbunden. Es hat sich daher eingebürgert, auch schwache Anziehungskräfte als chemische Bindungen zu bezeichnen, obwohl sie nicht stabil genug sind, um alleine zwei Atome wirksam zusammenzuhalten.

Chemische Bindungen können auf verschiedene Weise charakterisiert werden. Ein offensichtliches Merkmal ist die Bindungsstärke. Starke Bindungen sind fast durchwegs bei physiologischen Temperaturen stabil. Daher gehören Atome, die über kovalente Bindungen verknüpft sind, immer demselben Molekül an. Schwache sekundäre Bindungen werden hingegen leicht gespalten und sind einzeln nur von kurzer Dauer. Nur wenn sie in geordneten Gruppen vorkommen, sind sie über längere Zeit stabil. Die Stärke einer Bindung ist mit der Bindungslänge korreliert: Atome, die durch starke Bindungen verknüpft sind, kommen einander näher als die, zwischen denen nur schwache Wechselwirkungen bestehen. So beträgt z.B. der Abstand der Wasserstoffatome in einem kovalent gebundenen Wasserstoffmolekül ( $\text{H:H}$ )  $0,74 \text{ \AA}$ , wogegen die gleichen Atome, wenn statt dessen van der Waals-Kräfte zwischen ihnen wirksam sind, einen Abstand von  $1,2 \text{ \AA}$  haben.

Ein anderes wichtiges Charakteristikum ist die maximale Zahl von Bindungen, zu denen ein bestimmtes Atom fähig ist. Die Zahl der kovalenten Bindungen, die ein Atom eingehen kann, nennt man die Valenz oder Wertigkeit: Sauerstoff hat eine Wertigkeit von zwei: er kann nie mehr als zwei kovalente Bindungen eingehen. Im Fall der van der Waals-Kräfte sind die Möglichkeiten variabler, wobei der limitierende Faktor nur die sterischen Bedingungen sind.

Die Zahl der möglichen Bindungen wird nur durch die Zahl der Atome,



die sich gleichzeitig berühren können begrenzt. Die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen unterliegt strengeren Gesetzen. Kovalent gebundener Wasserstoff ist im allgemeinen zusätzlich nur an einer Wasserstoffbrücke beteiligt, Sauerstoff selten an mehr als zwei.

Der Winkel zwischen zwei Bindungen, die von einem einzigen Atom ausgehen, wird Bindungswinkel genannt. Zwischen zwei bestimmten kovalenten Bindungen ist er ungefähr immer der gleiche. Wenn Kohlenstoff z.B. vier Einfachbindungen eingeht, sind diese Bindungen tetraederförmig angeordnet (Bindungswinkel  $109^\circ$ ). Im Gegensatz dazu zeigen die Winkel zwischen sekundären Valenzen eine viel größere Variation.

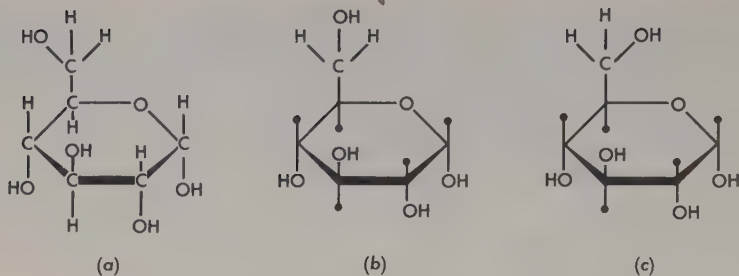
Bindungen sind auch in Bezug auf die Rotation, die sie zulassen, unterschiedlich. Einfachbindungen gestatten freie Rotation der gebundenen Atome (Abbildung 4-1), wogegen Doppel- und Dreifachbindungen recht starr sind. So müssen z.B. die Carbonyl ( $C=O$ ) und Imino ( $N-H$ ) Gruppen, die über die starre Peptidbindung miteinander verknüpft sind, immer in derselben Ebene liegen (Abbildung 4-2), da die Peptidbindung teilweise Doppelbindungscharakter hat. Die wesentlich schwächeren ionischen Bindungen zeigen ein ganz anderes Verhalten: sie legen der relativen Anordnung der gebundenen Atome zueinander keine Beschränkung auf.

## CHEMISCHE BINDUNGEN KÖNNEN MIT HILFE DER QUANTENMECHANIK ERKLÄRT WERDEN

Die Art der Kräfte, ob stark oder schwach, die zu chemischen Bindungen führen, blieben für den Chemiker bis zur Entwicklung der Quantentheorie des Atoms (Quantenmechanik) in den 20er Jahren unerklärlich. Dann wurden jedoch zum ersten Mal die verschiedenen empirischen Gesetze über die Bildung chemischer Bindungen auf eine solide theoretische Grundlage gestellt. Man erkannte, daß alle chemischen Bindungen, starke wie schwache, auf elektrostatischen Kräften beruhen. Die Quantenmechanik lieferte nicht nur Erklärungen für kovalente Bindungen (gemeinsame Elektronenpaare) sondern auch für das Zustandekommen schwacher Wechselwirkungen.

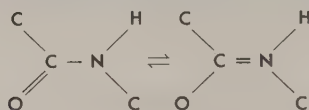
## DIE KNÜPFUNG EINER CHEMISCHEN BINDUNG GEHT MIT EINER ÄNDERUNG DER ENERGIEFORM EINHER

Bei der spontanen Bildung einer Bindung zwischen zwei Atomen wird immer ein Teil der Energie, die in den ungebundenen Atomen enthalten ist, freigesetzt und in eine andere Form von Energie umgewandelt. Je stärker die Bindung, desto größer ist die Energie, die bei ihrer Bildung frei wird.

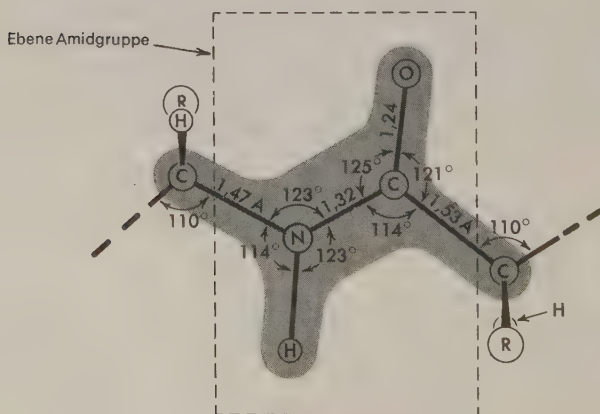


**ABBILDUNG 4-1** Rotation um die C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-Bindung in der Glucose. Da diese Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung eine Einfachbindung ist, können alle drei Konfigurationen a) b) und c) auftreten.

**ABBILDUNG 4-2** Die ebene Anordnung der Peptidbindung. Ein Teil der gestreckten Polypeptidkette wird hier gezeigt. Um die Peptidbindung ist wegen ihres teilweisen Doppelbindungscharakters fast keine Rotation möglich:



Alle Atome in der grau schattierten Zone müssen in derselben Ebene liegen. Um die restlichen zwei Bindungen, die die Polypeptidkonfiguration ausmachen, ist jedoch Rotation möglich. (Nachzeichnung nach L. Pauling, The Nature of the Chemical Bond, 3. Aufl., Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y., 1960, S. 498, mit Genehmigung).



Man kann also die Bindungsbildung zwischen zwei Atomen folgendermaßen darstellen



(4-1)

wobei AB die Verbindung darstellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist der Häufigkeit von Zusammenstößen zwischen A und B proportional. Im allgemeinen verwendet man als Energieeinheit die Kalorie, definiert als die Energiemenge, die notwendig ist, um ein Gramm Wasser von 14,5° C auf 15,5° C zu erwärmen. Da im allgemeinen tausende Kalorien notwendig sind, um ein Mol chemischer Bindungen zu spalten, werden die meisten Energieänderungen bei chemischen Reaktionen in Kilokalorien/Mol angegeben.

Atome, die über chemische Bindungen verknüpft sind, bleiben jedoch nicht für immer zusammen. Es gibt Kräfte, die chemische Bindungen spalten. Bei weitem die wichtigste ist die Wärmeenergie. Zusammenstöße mit sich schnell bewegendem (energiereichen) Molekülen oder Atomen können zur Spaltung einer Bindung führen. Während des Zusammenstoßes wird ein Teil der kinetischen Energie des sich bewegendem Moleküls für die Trennung der Atome einer Bindung verbraucht. Je schneller ein Molekül sich bewegt (und je höher die Temperatur ist) desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß es durch Stoß eine Bindung spaltet. Mit steigender Temperatur eines Molekülverbandes sinkt daher die Stabilität der vorhandenen Bindungen. Man kann die Spaltung einer Bindung folgendermaßen formulieren



(4-2)

Die Energiemenge, die man aufbringen muß, um eine Bindung zu spalten, ist genau gleich der, die bei ihrer Bildung frei wurde. Diese Gleichheit ergibt sich aus dem ersten Hauptsatz der Thermodynamik, der besagt, daß Energie weder geschaffen noch zerstört werden kann (wenn man von der Umwandlung von Masse in Energie absieht).

## GLEICHGEWICHT ZWISCHEN BINDUNGSBILDUNG UND BINDUNGSSPALTUNG

Jede Bindung ist daher das Ergebnis aus einer Kombination von bindungsbildenden Kräften, die aus elektrostatischen Wechselwirkungen herrühren und bindungsspaltenden Kräften. Sobald sich in einem geschlossenen System ein Gleichgewicht eingestellt hat, ist die Zahl der Bindungen, die pro Zeiteinheit gebildet werden, gleich der im gleichen Zeitraum gespaltenen. Der Anteil an gebundenen Atomen kann durch folgende Gleichung nach dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden

$$K \text{ äqu} = \frac{[AB]}{[A] \times [B]}$$

(4-3)

wobei  $K_{\text{äqu}}$  die Gleichgewichtskonstante darstellt und  $[A]$ ,  $[B]$  und  $[AB]$  die Konzentration der Stoffe A, B und AB in Mol/Liter. Ob wir von freiem A und B alleine, nur von dem Molekül AB, oder von einem Gemisch von AB und freiem A und B ausgehen ist egal; im Gleichgewicht werden immer die durch  $K_{\text{äqu}}$  gegebenen Werte erreicht.

## DER BEGRIFF DER FREIEN ENERGIE

Wenn sich die Konzentration der gebundenen Atome dem durch die Gleichgewichtskonstante gegebenen Wert nähert, ändert sich auch die Energieform. Diese Änderung wird am besten durch den physikalisch-chemischen Begriff der freien Energie  $G$  ausgedrückt (nach Gibbs, dem großen Physiker des 19. Jahrhunderts). Wir wollen hier keine genaue Definition des Begriffs der freien Energie geben, noch wollen wir zeigen, in welcher Weise sie sich von anderen Energieformen unterscheidet. Zu diesem Zweck sollte man sich an chemische Abhandlungen über den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik wenden. Wir müssen uns darauf beschränken, zu sagen, daß die *freie Energie den Teil der Energie darstellt, der zu Arbeitsleistungen herangezogen werden kann*.

Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik erklärt, daß alle spontanen Reaktionen mit einer Abnahme der freien Energie\* ( $\Delta G$  Negativ) verbunden sind. Wenn das Gleichgewicht erreicht ist, ändert sich die freie Energie nicht mehr ( $\Delta G = 0$ ).

Der Gleichgewichtszustand eines geschlossenen Systems von Atomen entspricht also dem Zustand geringster freier Energie.

Die freie Energie die bei der Annäherung an das Gleichgewicht abgegeben wird, wird entweder als Wärme freigesetzt oder zur Erhöhung der Entropie verwendet. Wir werden hier auch nicht versuchen eine Definition der Entropie zu geben, auch dafür sollte man sich an ein Lehrbuch der Chemie wenden. Wir wollen nur sagen, daß sie ein Maß für die Unordnung in einem System ist. Je größer die Unordnung, desto größer die Entropie. Das Vorhandensein von Entropie bedeutet, daß viele spontane Reaktionen nicht von Wärmeentwicklung begleitet sind. So wird zum Beispiel beim Auflösen von NaCl in Wasser sogar Wärme aufgenommen. Trotzdem sinkt die freie Energie und zwar wegen der Entropiezunahme, wenn die  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Ionen aus dem geordneten Zustand im Kristall in den wesentlich ungeordneteren in der Lösung übergehen.

---

\* In der Thermodynamik ist  $\Delta G$  als «freie Enthalpie» definiert (Reaktionen laufen bei konstantem Druck ab). Da zwischen der «freien Enthalpie» und der «freien Energie» (Reaktionen bei konstantem Volumen) bei biologischen Systemen zahlenmäßig kein wesentlicher Unterschied besteht, wurde der Ausdruck «freie Energie» vom Verlag beibehalten.



# ZWISCHEN $K_{\text{äqu}}$ UND $\Delta G$ BESTEHT EIN LOGARITHMISCHER ZUSAMMENHANG

Aus dem oben angeführten geht klar hervor, daß der Anteil an gebundenen Atomen größer ist, je stärker eine Bindung und je größer daher die Änderung der freien Energie ( $\Delta G$ ) bei der Bindungsbildung. Diese einfache Überlegung wird quantitativ durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\Delta G = RT \ln K_{\text{äqu}} \quad \text{oder} \quad K_{\text{äqu}} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (4-4)$$

wobei  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $e = 2,718$ ,  $\ln$  den natürlichen Logarithmus von  $K$  auf der Basis  $e$  und  $K_{\text{äqu}}$  die Gleichgewichtskonstante darstellen.

**TABELLE 4-1.** Die numerische Beziehung zwischen der Gleichgewichtskonstanten und  $\Delta G$  bei 25°C.

$K_{\text{äqu}}$	$\Delta G$ , kcal/Mol
0,001	4,089
0,01	2,726
0,1	1,363
1,0	0
10,0	-1,363
100,0	-2,726
1000,0	-4,089

Setzt man die geeigneten Werte für  $R$  ( $= 1,987$  cal/Grad/Mol) und  $T$  ( $= 298$  bei 25°C) ein, so folgt (Tabelle 4-1), daß  $\Delta G$ -Werte von 2 kcal/Mol ausreichen, um eine Reaktion, bei der Bindungen geknüpft werden, zum vollständigen Ablauf zu bringen, wenn alle Reaktionsteilnehmer in molaren Konzentrationen vorhanden sind.

## KOVALENTE BINDUNGEN SIND SEHR STARKE BINDUNGEN

Die  $\Delta G$ -Werte, die bei der Bildung kovalenter Bindungen aus freien Atomen wie Wasserstoff und Sauerstoff auftreten, sind sehr groß und negativ. Sie liegen gewöhnlich bei etwa -50 bis -110 kcal/Mol. Wenn man diese Werte in Gleichung 4-4 einsetzt, sieht man, daß das  $K_{\text{äqu}}$  der bindungsbildenden Reaktion dementsprechend sehr groß ist und daher die Konzentration von nicht gebundenen Wasserstoff- und Sauerstoffatomen sehr gering. So zeigt uns z.B. ein  $\Delta G$ -Wert von -100 kcal/Mol, daß man bei Erreichen

des Gleichgewichts nur eins von  $10^{40}$  Atomen im ungebundenen Zustand vorfindet, wenn man von Konzentrationen von 1 Mol/Liter der Reaktanten ausgeht.

### **ENERGIEWERTE SEKUNDÄRER BINDUNGEN LIEGEN ZWISCHEN 1 UND 7 KCAL/MOL**

Die wichtigsten Vertreter schwacher Wechselwirkungen in biologischen Systemen sind die van der Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brückenbindungen und ionische Bindungen. Wir werden später zeigen, daß manchmal die Unterscheidung zwischen einer Wasserstoff-Brückenbindung und einer ionischen Bindung ziemlich willkürlich ist. Von den drei genannten sind van der Waals-Bindungen am schwächsten. Ihre Energien (1-2 kcal/Mol) sind nur um wenig größer als die kinetische Energie der Wärmebewegung. Die Energiewerte von Wasserstoff-Brückenbindungen und ionischen Bindungen liegen zwischen 3 und 7 kcal/Mol.

In Lösung bilden fast alle Moleküle eine Reihe schwacher Wechselwirkungen zu benachbarten Atomen. Alle Moleküle können van der Waals-Bindungen eingehen; Wasserstoffbrücken- und ionische Bindungen werden zusätzlich zwischen Molekülen (Ionen) gebildet, die eine definierte Ladung tragen oder eine ungleiche Ladungsverteilung haben. Manche Moleküle können mehrere verschiedene Arten schwacher Wechselwirkungen eingehen. Aus energetischen Überlegungen folgt jedoch, daß Moleküle jeweils bevorzugt die stärkere Bindung eingehen.

### **BEI PHYSIOLOGISCHEN TEMPERATUREN WERDEN SCHWACHE WECHSELWIRKUNGEN STÄNDIG GESPALTEN UND NEU GEBILDET**

Die Energie der festesten schwachen Wechselwirkungen ist nur um 10 mal größer als die durchschnittliche kinetische Energie (Wärme) bei 25° C (0,6 kcal/Mol). Da die kinetische Energie in weiten Grenzen variiert, gibt es bei physiologischen Temperaturen immer wieder Moleküle mit einer kinetischen Energie, die ausreicht, um auch die festeste sekundäre Bindung zu spalten.

### **ENZYME SIND AN DER BILDUNG (SPALTUNG) SCHWACHER WECHSELWIRKUNGEN NICHT BETEILIGT**

Die durchschnittliche Lebensdauer einer sekundären Bindung beträgt nur den Bruchteil einer Sekunde. Die Zelle braucht deshalb nicht auf einen spezi-

fischen Mechanismus zurückzugreifen, um die Geschwindigkeit der Bildung und Spaltung schwacher Wechselwirkungen zu beschleunigen. Enzyme sind daher an Reaktionen sekundärer Bindungen nicht beteiligt.

## UNTERSCHIEDUNG ZWISCHEN POLAREN UND NICHT-POLAREN MOLEKÜLEN

Alle Arten schwacher Wechselwirkungen beruhen auf der Anziehung zwischen elektrischen Ladungen. Die Trennung von Ladungen kann dauerhaft oder nur kurzfristig sein, je nach der Art der beteiligten Atome. Z.B. sind die Elektronen eines Sauerstoffmoleküls ( $O_2$ ) symmetrisch zwischen den beiden Sauerstoffatomen verteilt; daher ist jedes seiner beiden Atome ungeladen. Im Gegensatz dazu haben wir im Wassermolekül ( $H_2O$ ) eine ungleichförmige Ladungsverteilung; hier werden die Bindungselektronen nicht gleichmäßig von den beteiligten Atomen beansprucht (Abbildung 4-3). Die Bindungselektronen werden vom Sauerstoff stärker angezogen, der somit eine beträchtliche negative Ladung trägt, wogegen die beiden Wasserstoffatome zusammen eine gleich große positive Ladung aufweisen. Der Schwerpunkt der positiven Ladung fällt aber nicht mit dem Schwerpunkt der negativen zusammen. Eine Kombination getrennter positiver und negativer Ladungen nennt man einen elektrischen *Dipol*. Eine ungleichmäßige Verteilung der Elektronen zwischen den Atomen reflektiert ihre verschieden große Elektronenaffinität. Atome, die eine größere Affinität für Elektronen

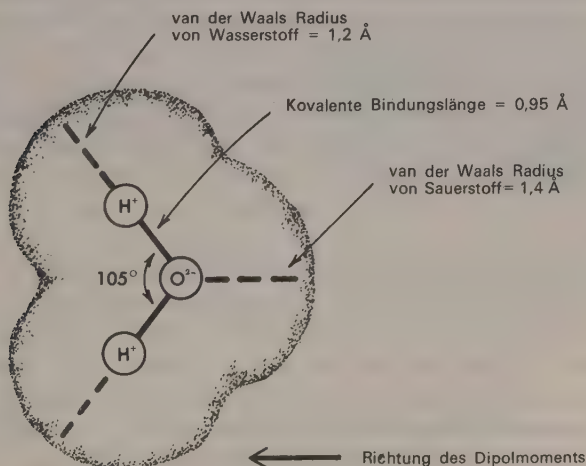


ABBILDUNG 4-3 Die Struktur eines Wassermoleküls.

zeigen, werden elektronegativ genannt, elektropositive Atome neigen zur Abgabe von Elektronen.

Verbindungen, die wie  $H_2O$  ein Dipolmoment enthalten, nennt man polare Verbindungen. Nicht-polare Verbindungen sind solche ohne resultierendes Dipolmoment. So haben z.B. in Methan ( $CH_4$ ) Kohlenstoff und Wasserstoff ähnliche Affinitäten für die gemeinsamen Elektronenpaare und es trägt daher weder der Kohlenstoff noch der Wasserstoff eine merkliche Ladung.

Die Ladungsverteilung in einem Molekül kann auch durch benachbarte Moleküle beeinflusst werden, insbesondere dann, wenn das Molekül, auf das sich der Einfluß auswirkt, polar ist. Das kann dazu führen, daß ein unpolares Molekül schwach polaren Charakter annimmt. Auch wenn das zweite beteiligte Molekül nicht polar ist, wird seine Gegenwart das unpolare beeinflussen und zu einer fluktuierenden Ladungsverteilung führen. Diese induzierten Effekte geben jedoch nur zu viel kleineren Ladungstrennungen Anlaß als dies bei polaren Molekülen der Fall ist. Die Folge sind kleinere Wechselwirkungsenergien und damit schwächere Bindungen.

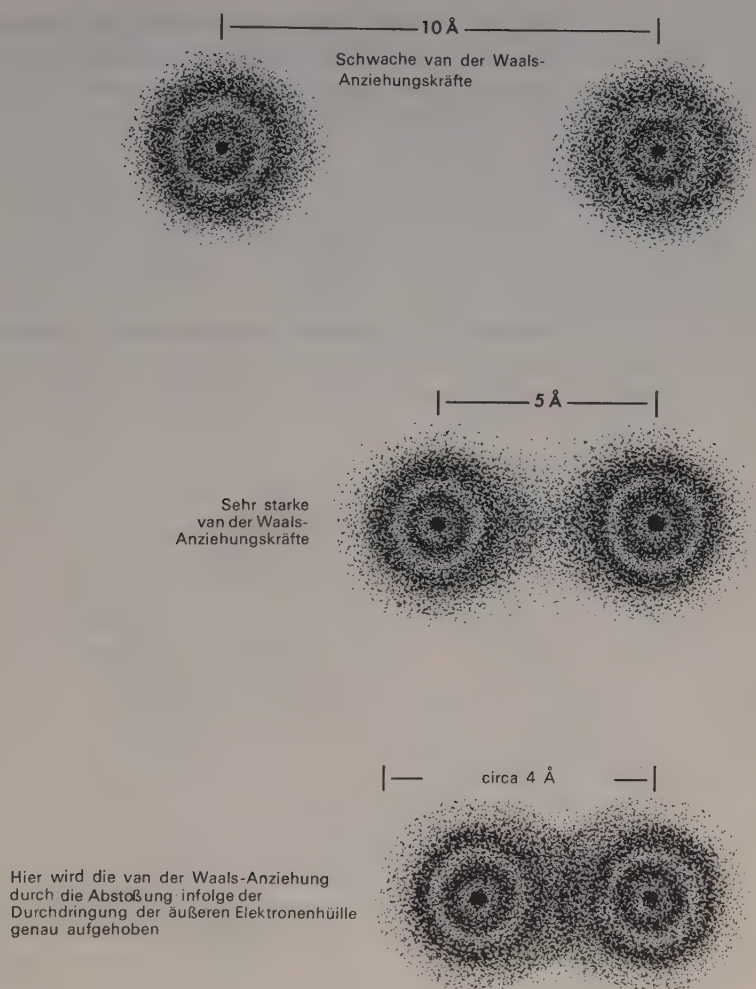
## VAN DER WAALS-KRÄFTE

Van der Waals-Kräfte werden durch unspezifische Anziehung zwischen zwei Atomen, die sich sehr nahe kommen, hervorgerufen. Sie sind nicht so sehr auf das Vorhandensein permanenter Dipole zurückzuführen, als auf die induzierten fluktuierenden Ladungen, die durch die enge Nachbarschaft der Moleküle hervorgerufen werden. Man findet sie daher bei allen Arten von Verbindungen, polar oder nicht polar. Van der Waals-Kräfte sind in hohem Maß vom Abstand der beteiligten Gruppen abhängig, da sie umgekehrt proportional zu der 6. Potenz des Abstandes sind (Abbildung 4-4).

Es gibt zusätzlich noch stärkere van der Waals-Abstoßungskräfte, die bei noch größerer Annäherung der Moleküle wirksam werden. Dieser Abstoßung ist eine Folge der Überlappung der äußeren Elektronenhüllen der beteiligten Atome. Van der Waals-Anziehungs- und -Abstoßungskräfte kompensieren einander bei einem bestimmten Abstand, der für jedes Atom charakteristisch ist. Man nennt den entsprechenden Abstand den van der Waals-Radius (Tabelle 4-2 und Abbildung 4-5). Die van der Waals-Bindungsenergien zweier Atome, die sich genau im Abstand der beiden van der Waals-Radien befinden, nehmen mit der Größe der beteiligten Atome zu. Für zwei durchschnittliche Atome ist sie ungefähr 1 kcal/Mol, nur um wenig größer als die durchschnittliche thermische Energie eines Moleküls bei Zimmertemperatur (0,6 kcal/Mol).

Daraus folgt, daß van der Waals-Kräfte bei physiologischen Temperaturen



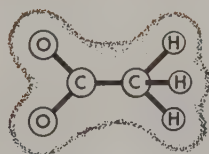


**ABBILDUNG 4-4** Illustration der van der Waals'schen Anziehungs- und Abstoßungskräfte und ihre Beziehung zu der Elektronenverteilung einatomiger Moleküle des Edelgases Argon (Nachzeichnung nach L. Pauling, *General Chemistry*, 2. Aufl., Freeman, San Francisco, 1958, S. 322, mit Genehmigung).

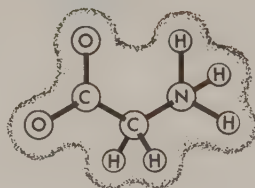
nur dann wirksam werden, wenn mehrere Atome eines Moleküls an mehrere Atome eines anderen gebunden sind. Nur in diesem Fall ist die Wechselwirkungsenergie viel größer als die Tendenz der Moleküle zur Dissoziation, die aus der ungeordneten thermischen Bewegung resultiert. Die Moleküle müssen in ihrer Form gut zueinander passen, damit mehrere Atome in

TABELLE 4-2. Van der Waals-Radiusen der Atome, die in biologischen Molekülen vorkommen.

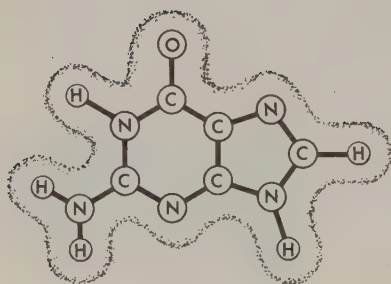
Atom	van der Waals-Radius, Å
H	1,2
N	1,5
O	1,4
P	1,9
S	1,85
CH <sub>3</sub> Gruppe	2,0
«halbe Dicke» eines aromatischen Moleküls	1,7



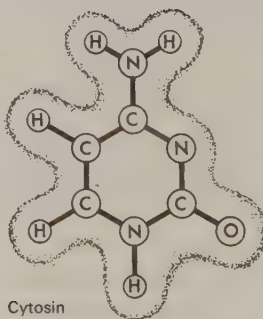
Acetat



Glycin



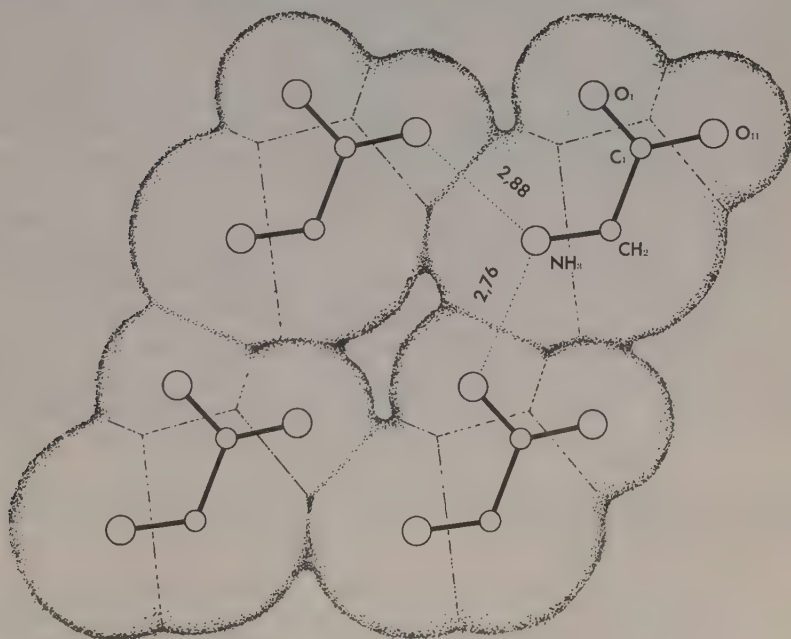
Guanin



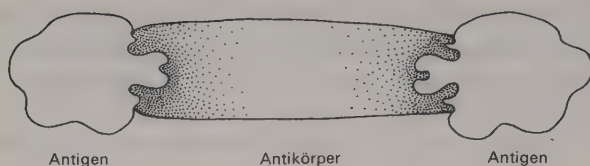
Cytosin

ABBILDUNG 4-5 Darstellungen verschiedener Moleküle; die van der Waals-Radiusen der Atome sind im Umriß angedeutet.

wirksame Wechselwirkung treten können, da der Abstand zwischen zwei reagierenden Atomen nicht viel größer sein darf als die Summe der beiden van der Waals-Radien (Abbildung 4-6). Die Bindungsenergie nähert sich sehr rasch Null, wenn die Entfernung auch nur geringfügig größer ist. Daher kommen die stärksten van der Waals-Bindungen dann zustande, wenn ein Molekül eine Einbuchtung besitzt, die genau komplementär zu einer aus einem anderen Molekül herausragenden Gruppe ist (Abbildung 4-7). Man nimmt an, daß solche Situationen bei der Reaktion eines Antigens mit seinem spezifischen Antikörper vorliegen (siehe Kapitel 15). In diesen Fällen kann die Bindungsenergie bis zu 10 kcal/Mol betragen, sodaß Antigen-Antikörper-Komplexe kaum je zerfallen. Viele polare Moleküle gehen nur selten van der Waals-Bindungen ein, da sie durch Bildung anderer Bindungsarten energetisch stabilere Zustände (unter größerer Abgabe freier Energie) erreichen können.



**ABBILDUNG 4-6** Molekülanordnung in einer Schicht eines Kristalls der Aminosäure Glycin. Die Packung der Moleküle wird durch die van der Waals-Radien der einzelnen Gruppen bestimmt, mit Ausnahme der N-H...O Kontakte die aufgrund von Wasserstoffbrücken verkürzt sind. (Nachzeichnung nach L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y., 1960, S. 262, mit Genehmigung).



**ABBILDUNG 4-7** Schematische Darstellung der komplementären Beziehung zwischen den Oberflächenkonfigurationen eines Antigens und seines zugehörigen Antikörpers, wodurch die Bildung schwacher Wechselwirkungen ermöglicht wird.

## WASSERSTOFF-BRÜCKENBINDUNGEN

Wasserstoff-Brückenbindungen können sich zwischen kovalent gebundenem Wasserstoff mit einer positiven Partialladung und einem negativ geladenen kovalent gebundenen Akzeptoratom bilden (Abbildung 4-8). So wird z.B. das Wasserstoffatom der Iminogruppe (N-H) vom negativ geladenen Sauerstoffatom einer Ketogruppe ( $C=O$ ) angezogen.

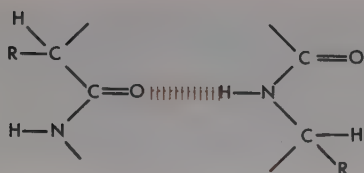
Manchmal gehören die Atome, die eine Wasserstoffbrücke bilden, auch Gruppen mit einer ganzen Ladungseinheit an (z.B.  $NH_3^+$  oder  $COO^-$ ). In anderen Fällen tragen der Donator-Wasserstoff und die negativen Akzeptoratomene weniger als eine Ladungseinheit.

An den biologisch wichtigsten Wasserstoffbrücken sind Wasserstoffatome beteiligt, die kovalent an Sauerstoff ( $O-H$ ) oder Stickstoff ( $N-H$ ) gebunden sind. Genauso sind die negativen Akzeptoratomene meistens Stickstoff oder Sauerstoff. In Tabelle 4-3 sind einige der wichtigsten Wasserstoff-Brückenbindungen angeführt. Die Bindungsenergien variieren zwischen 3 und 7 kcal/Mol, wobei die stärkeren Bindungen einer größeren Ladungsdifferenz zwischen Donator- und Akzeptoratomene entsprechen. Wasserstoffbrücken sind daher schwächer als kovalente Bindungen, aber wesentlich stärker als

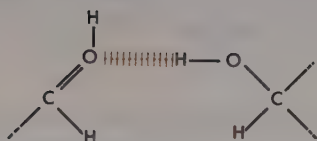
**TABELLE 4-3.** Ungefähre Bindungslängen biologisch wichtiger Wasserstoff-Brückenbindungen.

Bindung	Ungefähre Bindungslänge
$O-H \cdots O$	$2,70 \pm 0,10$
$O-H \cdots O^-$	$2,63 \pm 0,10$
$O-H \cdots N$	$2,88 \pm 0,13$
$N-H \cdots O$	$3,04 \pm 0,13$
$N^+H \cdots O$	$2,93 \pm 0,10$
$N-H \cdots N$	$3,10 \pm 0,13$

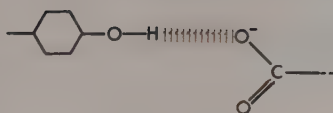




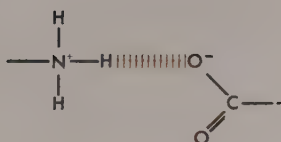
Wasserstoffbrücke zwischen Peptidgruppen



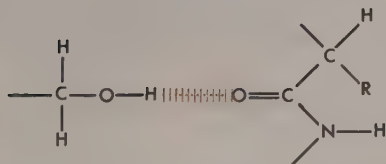
Wasserstoffbrücke zwischen zwei Hydroxylgruppen



Wasserstoffbrücke zwischen einer geladenen Carboxylgruppe und der Hydroxylgruppe von Tyrosin



Wasserstoffbrücke zwischen einer geladenen Aminogruppe und einer geladenen Carboxylgruppe



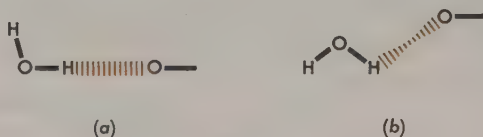
Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe von Serin und einer Peptidgruppe

ABBILDUNG 4-8 Beispiele für Wasserstoff-Brückenbindungen in biologischen Molekülen.

van der Waals-Kräfte. Eine Wasserstoffbrücke bringt somit zwei Atome näher zusammen als die Summe ihrer beiden van der Waals-Radien, aber nicht ganz so nahe wie eine kovalente Bindung.

Zum Unterschied von van der Waals-Bindungen haben Wasserstoff-

brücken eine deutliche Richtung. Bei optimaler Bindungsstärke ist das Wasserstoffatom direkt auf das Akzeptoratom hin gerichtet. Besteht diese direkte Ausrichtung nicht, ist die Bindungsenergie viel geringer. Wasserstoffbrücken sind außerdem viel spezifischer als van der Waals-Bindungen, da sie die Existenz von Molekülen mit komplementären Wasserstoff-Donatoren und Akzeptorgruppen voraussetzen.



**ABBILDUNG 4-9** Ausrichtung der Wasserstoff-Brückenbindung. In a) ist der Vektor entlang der kovalenten O-H Bindung direkt auf den Akzeptor-Sauerstoff gerichtet; es resultiert dadurch eine starke Bindung; In b) ist der Vektor vom Sauerstoffatom weg gerichtet: die Bindung ist daher viel schwächer.

#### MANCHE IONISCHEN BINDUNGEN SIND EIGENTLICH WASSERSTOFF-BRÜCKENBINDUNGEN

Viele organische Moleküle enthalten ionische Gruppen, die eine oder mehrere positive oder negative Ladungseinheiten tragen. So enthalten z.B. die negativ geladenen Mononukleotide Phosphatgruppen ( $\text{PO}_3^{3-}$ ) mit drei negativen Einheitsladungen, wogegen jede Aminosäure (außer Prolin) eine negativ geladene Carboxylgruppe ( $\text{COO}^-$ ) und eine positiv geladene Aminogruppe ( $\text{NH}_3^+$ ) mit je einer Ladungseinheit trägt. Diese geladenen Gruppen werden normalerweise durch benachbarte, entgegengesetzt geladene Gruppen neutralisiert. Man nennt die elektrostatischen Kräfte, die zwischen den beiden geladenen Gruppen wirken, ionische Bindungen. Die durchschnittliche Bindungsenergie in wässrigen Lösungen beträgt ungefähr 5 kcal/Mol.

In vielen Fällen wird die Ladung ionisierter organischer Moleküle entweder durch ein anorganisches Kation wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , oder  $\text{Mg}^{2+}$  oder ein anorganisches Anion wie  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{SO}_4^{2-}$  neutralisiert. Wenn dieser Vorgang in wässriger Lösung stattfindet, nehmen die neutralisierenden Kationen und Anionen keine feste Position ein, da anorganische Ionen gewöhnlich von einer Hülle aus Wassermolekülen umgeben sind und sich daher nicht direkt an die entgegengesetzt geladenen Gruppen binden können. Man glaubt deshalb heute, daß in wässrigen Lösungen elektrostatische Bindungen an die anorganischen Kationen und Anionen der Umgebung für die Bestimmung der spezifischen Gestalt organischer Moleküle keine besondere Rolle spielen.

Andererseits werden streng gerichtete Bindungen gebildet, wenn die entgegengesetzt geladenen Gruppen Wasserstoffbrücken bilden können. So werden z.B. die  $\text{COO}^-$  und  $\text{NH}_3^+$  Gruppen häufig durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Da diese Wasserstoffbrücken stärker sind als die zwischen Gruppen, die weniger als eine Einheitsladung tragen, sind die Abstände entsprechend verkürzt. Auch zwischen einer Gruppe mit einer ganzen Ladungseinheit und einer, die nur eine Partialladung trägt, können sich starke Wasserstoffbrücken ausbilden. So bindet sich z.B. ein Wasserstoff einer Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ) relativ fest an den Sauerstoff einer Carboxylgruppe ( $\text{COO}^-$ ).

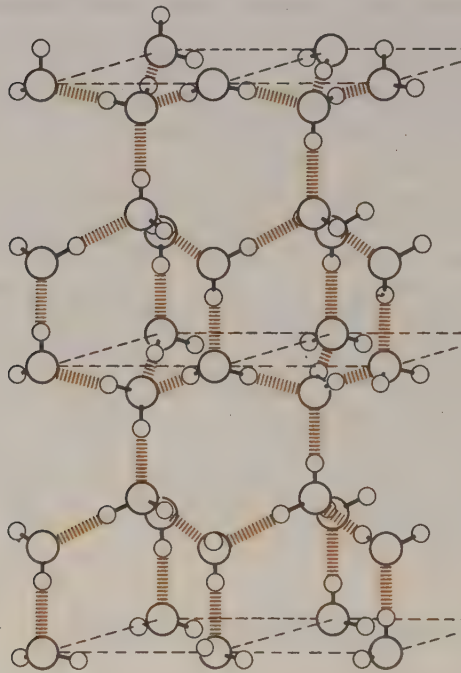
### **SCHWACHE WECHSELWIRKUNGEN ERFORDERN KOMPLEMENTÄRE MOLEKÜLOBERFLÄCHEN**

Schwache Wechselwirkungen können sich nur auswirken, wenn die miteinander reagierenden Oberflächen nahe beisammen sind. Die Annäherung ist jedoch nur dann möglich, wenn die Moleküloberflächen komplementäre Strukturen aufweisen, und zwar so, daß einer herausragenden Gruppe (oder positiven Ladung) auf einer Oberfläche eine Vertiefung (oder negative Ladung) auf der anderen entspricht; d.h. die beiden Reaktionspartner müssen zueinander in einer Schlüssel zu Schloß Beziehung stehen. Für die Zelle bedeutet das, daß manche Moleküle nie in Wechselwirkung mit Molekülen der gleichen Art treten, da diese Moleküle die erforderlichen Symmetriebedingungen nicht erfüllen. So enthalten z.B. manche (polare) Moleküle Donator-Wasserstoffatome, aber keine geeigneten Akzeptoren, wogegen andere zwar Wasserstoffbrücken akzeptieren können, aber keine geeigneten Donatoren besitzen. Andererseits gibt es auch in der Zelle eine Reihe von Molekülen, deren Symmetrie eine Wechselwirkung mit der gleichen Art erlaubt; das wichtigste Beispiel dafür ist Wasser.

### **$\text{H}_2\text{O}$ -MOLEKÜLE BILDEN WASSERSTOFFBRÜCKEN**

Unter physiologischen Bedingungen ist das  $\text{H}_2\text{O}$  Molekül nur sehr selten zu  $\text{H}^+$  und  $\text{OH}^-$  dissoziiert. Wasser liegt statt dessen als polares  $\text{H}-\text{O}-\text{H}$  Molekül vor. Sowohl der Wasserstoff als auch der Sauerstoff können starke Wasserstoffbrücken bilden. In jedem  $\text{H}_2\text{O}$  Molekül kann das Sauerstoffatom Brückenbindungen zu zwei Wasserstoffen anderer Moleküle bilden; jeder Wasserstoff kann eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff eines benachbarten Moleküls schlagen. Diese Bindungen sind tetraederförmig angeordnet (Abbildung 4-10), sodaß im flüssigen und kristallisierten Zustand jedes Molekül im allgemeinen vier unmittelbare Nachbarn hat, einen in jeder der vier

Richtungen des Tetraeders. Im Eis sind diese Bindungen sehr starr und die Anordnung der Moleküle zueinander festgelegt. Oberhalb des Schmelzpunktes ( $0^{\circ}\text{C}$ ) reicht die thermische Energie der Bewegung aus, um die Wasserstoff-Brückenbindungen zu spalten, weshalb die einzelnen Wassermoleküle ständig wechseln können. Aber auch in der flüssigen Phase sind die meisten Wassermoleküle zu jedem Zeitpunkt an vier starken Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt.



**ABBILDUNG 4-10** Schematische Darstellung des Kristallgitters von  $\text{H}_2\text{O}$ . Der Energiegewinn aus der Bildung spezifischer Wasserstoff-Brückenbindungen ( $|||$ ) zwischen Wassermolekülen begünstigt die Anordnung der Moleküle in benachbarten Tetraedern. Sauerstoffatome sind durch große Kreise, Wasserstoffatome durch kleine Kreise dargestellt. Obwohl die Starrheit des Systems von der Temperatur der Moleküle abhängt, ist die abgebildete Anordnung doch sowohl in Wasser als in Eis vorherrschend (Nach L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y., 1960, S. 465, mit Genehmigung).



## SCHWACHE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN MOLEKÜLEN IN WÄSSRIGER LÖSUNG

Die durchschnittliche Energie sekundärer Bindungen ist zwar klein im Verhältnis zu der kovalenter Bindungen, aber doch groß genug im Vergleich zur thermischen Energie, um sicherzustellen, daß die meisten Moleküle in wäßriger Lösung schwache Wechselwirkungen mit anderen Molekülen eingehen. Das Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Molekülen ist durch Gleichung 4-4 gegeben, die Korrekturfaktoren für hohe Konzentrationen von Molekülen in einer Lösung enthält. Wir sehen daraus, daß Wechselwirkungsenergien von nur 2-3 kcal/Mol bei physiologischen Temperaturen ausreichen, um die meisten Moleküle zur Bildung der maximalen Anzahl relativ starker sekundärer Bindungen zu veranlassen.

Die spezielle Struktur einer Lösung ist zu jedem Zeitpunkt in starkem Maß von der Natur der gelösten Stoffe abhängig, und zwar nicht nur wegen der besonderen Gestalt verschiedener Moleküle, sondern auch wegen der verschiedenen sekundären Bindungen, die diese Moleküle eingehen. Diese Unterschiede führen dazu, daß sich ein Molekül so lange frei bewegen kann, bis es in die Nähe eines anderen Moleküls kommt, mit dem es die stärkst möglichen sekundären Wechselwirkungen eingehen kann.

Lösungen sind natürlich nicht statisch. Da die Bindungen durch die Wärmeenergie immer wieder gespalten werden, wechselt die Struktur einer Lösung ständig von einer Anordnung zu einer anderen mit ungefähr gleichem Energieinhalt. Ebenso bedeutend ist in biologischen Systemen auch noch, daß durch den Stoffwechsel Moleküle ständig in andere umgewandelt werden. Dadurch wird zwangsläufig auch die Art der möglichen sekundären Bindungen verändert. Die Struktur der Lösung in einer Zelle ändert sich also ständig und zwar nicht nur aufgrund der thermischen Bewegung sondern auch wegen der Stoffwechselveränderungen der gelösten Zellinhaltsstoffe.

## ORGANISCHE MOLEKÜLE, DIE WASSERSTOFF-BRÜCKENBINDUNGEN EINGEHEN, SIND WASSERLÖSLICH

Die Bindungsenergie einer Wasserstoffbrücke ist wesentlich größer als die der van der Waals-Bindung. Daher werden Moleküle die Wasserstoffbrücken bilden können, diese Bindungen den van der Waals-Kontakten vorziehen. Wenn wir z.B. versuchen, Wasser mit einer Verbindung wie Benzol zu mischen, die keine Wasserstoffbrücken bilden kann, so trennen sich die Wassermoleküle rasch von den Benzolmolekülen. Die  $H_2O$ -Moleküle bilden untereinander Wasserstoffbrücken, die Benzolmoleküle werden durch van der Waals-Bindungen zusammengehalten. Es ist daher praktisch unmöglich, ein Molekül, das keine Wasserstoffbrücken bildet, in Wasser zu lösen.

*Es werden die energetisch <sup>aufzuwendenden</sup> ~~stabilsten~~ Bindungen hergestellt*

Andererseits sind polare Moleküle wie Glucose und Brenztraubensäure teilweise wasserlöslich, da sie eine große Zahl chemischer Gruppen enthalten, die starke Wasserstoffbrücken bilden können (z.B.  $=O$ , oder  $-OH$ ); sie sind «hydrophil» im Gegensatz zu «hydrophob». Die Ursache für die Löslichkeit liegt darin, daß bei Verteilung dieser Gruppen in Wasser zwar Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Wassermolekülen gespalten werden, gleichzeitig aber Wasserstoffbrücken zwischen Glucose und Wasser gebildet werden. Die resultierenden Anordnungen sind allerdings energetisch kaum je so günstig wie die Anordnung aus Wassermolekülen alleine; daher zeigen auch sehr stark polare Moleküle nur eine begrenzte Löslichkeit.

Es sind also fast alle Moleküle, die eine Zelle ständig durch Nahrungsaufnahme oder durch Biosynthese erwirbt, teilweise wasserunlöslich. Diese Moleküle stoßen infolge der thermischen Bewegung ständig aufeinander bis sie ein entsprechendes Molekül mit komplementärer Oberfläche finden, an die sie sich anheften können, wodurch Wassermoleküle für Wasser-Wasser-Wechselwirkungen frei werden.

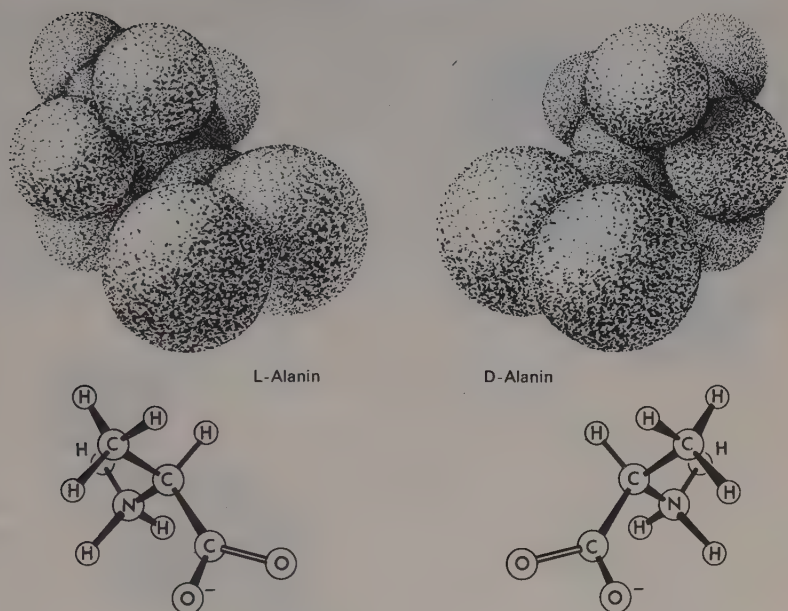
#### **DIE EINMALIGKEIT DER MOLEKÜLGESTALT; DER BEGRIFF EINER SELEKTIVEN «KLEBRIGKEIT»**

Obwohl die meisten Moleküle einer Zelle nur eine begrenzte Anzahl verschiedener funktioneller Gruppen wie  $OH$ ,  $NH_2$  und  $CH_3$  tragen, wird mit großer Spezifität bestimmt, welche Moleküle, sich aneinander lagern. Der Grund dafür liegt in den einmaligen Bindungseigenschaften jedes Moleküls. Sehr klar zeigt sich das an der Spezifität verschiedener Stereoisomere: so sind Proteine immer aus L-Aminosäuren aufgebaut und nie aus ihren Spiegelbildern, den D-Aminosäuren (siehe Abbildung 4-11). Obwohl L- und D-Aminosäuren völlig identische kovalente Bindungen enthalten, sind die Bindungseigenschaften gegenüber asymmetrischen Molekülen oft sehr verschieden. So sind z.B. die meisten Enzyme spezifisch für L-Aminosäuren. Wenn eine L-Aminosäure sich an ein bestimmtes Enzym binden kann, ist die D-Aminosäure dazu nicht imstande.

Es gilt als allgemeine Regel, daß die meisten Moleküle einer Zelle nur mit einer begrenzten Zahl anderer Moleküle starke sekundäre Wechselwirkungen eingehen können. Teilweise ist das darauf zurückzuführen, daß alle Moleküle in biologischen Systemen in wäßrigem Medium existieren. Die Bindungsbildung in einer Zelle hängt nicht nur davon ab, ob zwei Moleküle sich fest aneinander binden können, sondern auch davon, ob die resultierende Bindung es dem wäßrigen Lösungsmittel gestattet, eine maximale Zahl starker Wasserstoff-Brückenbindungen einzugehen.

Die starke Tendenz des Wassers, unpolare Gruppen auszuschließen, wird

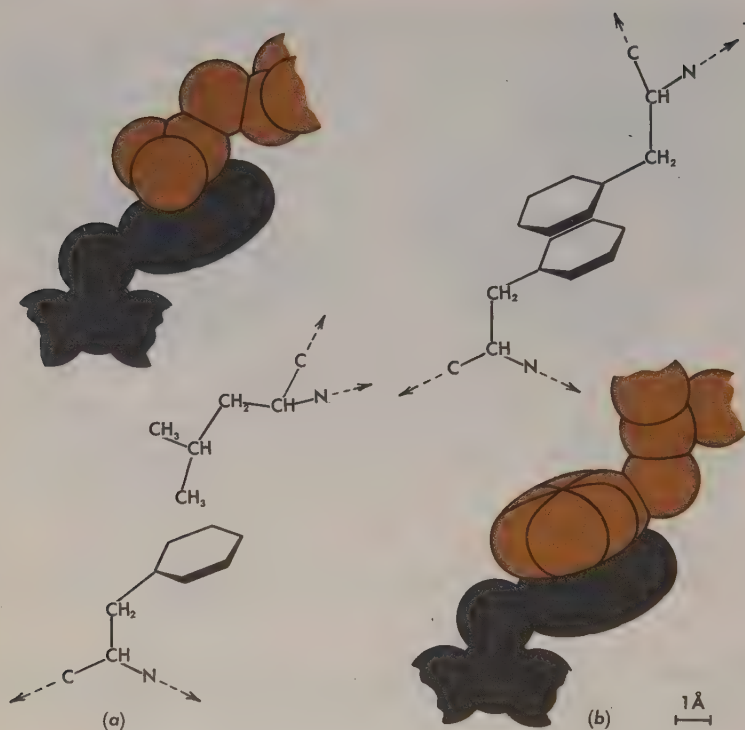
L-Form: vom  $\alpha$  C aus schaut H zu Dr  
 → im Uhrzeigersinn gelesen  
 CO-R-N → L-Form



**ABBILDUNG 4-11** Die beiden Stereoisomeren der Aminosäure Alanin (Nach L. Pauling, General Chemistry, 2. Aufl., Freeman, San Francisco, 1958, S. 598, mit Genehmigung).

häufig als «hydrophobe Bindung» bezeichnet. Manche Chemiker verstehen darunter alle Bindungen zwischen unpolaren Gruppen in wässrigem Medium (Abbildung 4-12). In gewissem Sinn ist dieser Ausdruck eine Fehlbezeichnung, die nur verwirrt, da das Phänomen, das er zu beschreiben sucht, nicht die Anwesenheit sondern die Abwesenheit einer Bindung ist. (Die Bindungen, die sich zwischen den unpolaren Gruppen bilden, sind auf van der Waals-Anziehungskräfte zurückzuführen.) Andererseits ist der Ausdruck «hydrophobe Bindungen» insofern nützlich, als er die Tatsache betont, daß unpolare Gruppen sich so anzuordnen versuchen, daß sie nicht mit Wassermolekülen in Kontakt kommen.

Man betrachte z.B. die Energieunterschiede in wässriger Lösung zwischen der Bindung der Aminosäure Alanin und der von Glycin an ein drittes Molekül, dessen Oberfläche der des Alanins komplementär ist. Alanin unterscheidet sich von Glycin durch eine zusätzliche Methylgruppe. Wenn Alanin an das dritte Molekül gebunden wird, liefern die van der Waals-Kontakte der Methylgruppe eine Energie von 1 kcal/Mol, welche nicht freigesetzt wird, wenn statt dessen Glycin gebunden wird. Dieser kleine Energieunter-



**ABBILDUNG 4-12** Beispiel für die van der Waals (hydrophoben) Bindungen zwischen den unpolaren Seitenketten von Aminosäuren. Die Wasserstoffe sind nicht individuell aufgeführt. Wegen größerer Übersichtlichkeit wurden die van der Waals-Radien um 20% verringert. Die Strukturformeln neben den Raumformeln zeigen die Anordnung der Atome an; a) Phenylalanin-Leucin-Bindung, b) Phenylalanin-Phenylalanin-Bindung. (Nach H. A. Scheraga, aus *The Proteins*, H. Neurath (Ed.), 2. Aufl., Bd. I. Academic Press, New York, 1963, S. 527, mit Genehmigung).

schied alleine würde, wie aus Gleichung 4-4 folgt, nur einen Faktor von 6 zwischen der Bindung von Alanin und Glycin geben. Diese Berechnung zieht jedoch die Tatsache nicht in Betracht, daß Wasser Alanin viel stärker ausschließt als Glycin. Die Anwesenheit der  $\text{CH}_3$ -Gruppe des Alanins stört die Gitterstruktur des Wassers viel mehr als die Wasserstoff-Seitenkette des Glycins. Es ist heute noch sehr schwierig, die Größe des Korrekturfaktors vorauszusagen, der für diese Störung des Wassergitters durch hydrophobe Seitengruppen eingeführt werden muß. Man nimmt zur Zeit an, daß Wasser Alanin mit einer hydrophoben Kraft ausschließt und einem dritten Molekül



zuführt, die um 2-3 kcal/Mol größer ist als die, mit der Glycin ausgeschlossen wird.

Wir kommen damit zu dem wichtigen Schluß, daß der energetische Unterschied zwischen Bindungen sogar sehr ähnlicher Moleküle an ein drittes Molekül im wäßrigen Milieu der Zelle mindestens um 2-3 kcal/Mol größer ist als in nicht-wäßrigen Lösungsmitteln, falls der Unterschied durch eine unpolare Gruppe gegeben ist. Häufig betragen die Unterschiede 3-4 kcal/Mol, da die beteiligten Moleküle meistens polare Gruppen enthalten, die Wasserstoffbrücken bilden können.

### DER VORTEIL VON $\Delta G$ -WERTEN ZWISCHEN 2 UND 5 KCAL/MOL

Wir haben gesehen, daß die Energiedifferenz einer schwachen Wechselwirkung (2 bis 5 kcal/Mol) häufig ausreicht, um sicherzustellen, daß sich ein Molekül bevorzugt an eine bestimmte Gruppe anderer Moleküle bindet. Es ist ebenso wichtig, daß diese Energiedifferenz andererseits nicht so groß ist, daß sich innerhalb der Zelle starre Gitterstrukturen ausbilden können -der Zellinhalt kristallisiert nicht aus- was der Fall wäre, wenn die Energie sekundärer Bindungen um ein Vielfaches größer wäre. Größere Energieunterschiede würden dazu führen, daß sekundäre Wechselwirkungen nur selten aufgehoben werden könnten; niedrige Diffusionsgeschwindigkeiten wären die Folge, die mit der Existenz einer Zelle unvereinbar sind.

### ENZYM-SUBSTRAT-KOMPLEXE WERDEN DURCH SCHWACHE WECHSELWIRKUNGEN ZUSAMMENGEHALTEN

Schwache Wechselwirkungen sind notwendigerweise die Grundlage für die anfängliche Vereinigung von Enzymen mit ihren Substraten. Enzyme binden nicht wahllos alle Moleküle, sondern zeigen im allgemeinen nur gegenüber ihrem spezifischen Substrat eine merkliche Affinität.

Da Enzyme beide Richtungen einer chemischen Reaktion katalysieren, müssen sie spezifische Affinitäten für beide Arten der Reaktanten haben. In manchen Fällen ist es möglich, die Gleichgewichtskonstante für die Bindung eines Enzyms an eins seiner Substrate zu berechnen, woraus man nach Gleichung 4-4 das  $\Delta G$  der Bindungsbildung erhält. Aus der Berechnung kann man dann schließen, welcher Bindungstyp vorliegt.  $\Delta G$ -Werte, die zwischen 5 und 10 kcal/Mol liegen, weisen darauf hin, daß eine oder mehrere starke sekundäre Wechselwirkungen der spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion zugrunde liegen. Es ist bemerkenswert, daß die  $\Delta G$ -Werte dieser Bin-

dungen nie besonders groß sind; Enzym-Substrat-Komplexe können daher infolge zufälliger thermischer Bewegungen schnell gebildet und gespalten werden. Daraus erklärt sich, wieso Enzyme so rasch reagieren können, manchmal bis zu  $10^6$  Umsetzungen pro Sekunde. Wenn Enzyme durch stabilere Bindungen an ihre Substrate gebunden wären, würde die Reaktion viel langsamer ablaufen.

## DIE MOLEKÜLGESTALT WIRD MEISTENS DURCH SCHWACHE WECHSELWIRKUNGEN BESTIMMT

Die Gestalt vieler Moleküle ist durch die Anordnung der kovalenten Bindungen automatisch festgelegt. Eine solche Starrheit liegt dann vor, wenn Gruppen über kovalente Bindungen, um die eine freie Rotation unmöglich ist, gebunden sind. Rotation ist nur dann möglich, wenn Einfachbindungen vorliegen. (So können z.B. die Methylgruppen des Äthans,  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$ , frei um die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung rotieren). Wenn mehr als ein Elektronenpaar an einer Bindung beteiligt ist, ist freie Rotation nicht mehr möglich; tatsächlich müssen die beteiligten Atome in der gleichen Ebene liegen. Daher sind z.B. die aromatischen Purin- und Pyrimidinringe ebene Moleküle von  $3,4 \text{ \AA}$  Dicke. Die Gestalt aromatischer Moleküle ist bekannt. Sie sind fast immer flach, unabhängig von ihrer Umgebung.

Im Gegensatz dazu läßt die Möglichkeit der Rotation um die Einfachbindungen erwarten, daß ein Molekül mit Einfachbindungen in vielen verschiedenen Formen vorliegen kann. Die theoretischen Möglichkeiten sind jedoch in den seltensten Fällen voll ausgenutzt, da sich die verschiedenen möglichen 3-D-Strukturen durch die Zahl der starken sekundären Wechselwirkungen, die gebildet werden können, unterscheiden. Im allgemeinen gibt es immer eine bestimmte Konfiguration, die einen wesentlich geringeren Energieinhalt hat als alle anderen möglichen geometrischen Anordnungen.

Zwei Arten schwacher Wechselwirkungen können die endgültige 3-D-Gestalt beeinflussen. Eine Art ist intramolekular und bildet sich zwischen Atomen, die entlang einer Kette durch kovalente Bindungen verknüpft sind. Intramolekulare Bindungen führen häufig dazu, daß ein lineares Molekül sich zusammenfaltet, sodaß Atome in Kontakt treten können, die an sich durch eine Reihe kovalenter Bindungen voneinander getrennt sind. Die endgültige Gestalt solcher Moleküle ist oft sehr kompakt (globulär). Die andere Bindungsart ist intermolekular, also zwischen Atomen, die nicht durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. In den Fällen, in denen die stabilste 3-dimensionale Konfiguration durch intermolekulare Bindungen zustande kommt, sind die Moleküle meistens gestreckt (faserförmig).

Es ist nicht einfach, die genaue Gestalt eines Makromoleküls aus seinen

intermolekulare  $\rightarrow$  faserförmig  
intramolekulare  $\rightarrow$  globulär

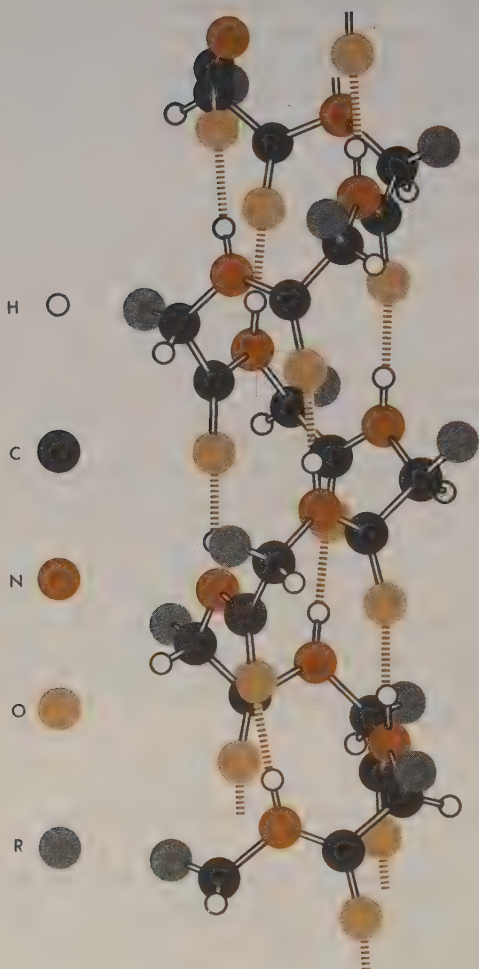
kovalenten Bindungen vorauszusagen; obwohl eine bestimmte Konfiguration für ein Protein oder eine Nukleinsäure energetisch bevorzugt sein mag, können wir sie noch nicht von unseren Kenntnissen der Bindungsenergien ableiten. Es gibt zwei Gründe für diese Schwierigkeiten. Der eine ist rein logistisch. Die Anzahl der möglichen Konfigurationen einer Nukleinsäure oder auch eines kleinen Proteinmoleküls ist ungeheuer groß. Mit den heute üblichen Methoden für den Bau von Molekülmodellen kann eine Person alleine, oder auch eine kleine Gruppe von Leuten, die Summe der schwachen Wechselwirkungsenergien für jede mögliche Konfiguration unmöglich in einer vernünftigen Zeitspanne berechnen. Jahre wären dafür erforderlich. Mit Hilfe von Computern sollte diese Aufgabe in Zukunft wesentlich erleichtert werden. Der zweite Grund, aus dem es heute noch unmöglich ist, die Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren zu berechnen, ist der, daß unsere Kenntnisse über die Natur der schwachen Wechselwirkungen noch sehr unvollständig sind; in vielen Fällen kennen wir weder die genauen Bindungsenergien noch die Winkel, die die verschiedenen Bindungen miteinander bilden.

Im Augenblick ist es nur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse möglich, die genaue Gestalt von Proteinen oder Nukleinsäuren zu bestimmen. Glücklicherweise beginnen sich aus diesen experimentellen Strukturuntersuchungen einige allgemeine Regeln abzuzeichnen, aus denen wir schließen können, welche schwachen chemischen Wechselwirkungen für die Bestimmung der Molekülgestalt von Makromolekülen die größte Rolle spielen. Insbesondere weisen diese Ergebnisse immer wieder auf die eminente Bedeutung der Wechselwirkung zwischen den Makromolekülen und Wasser hin, dem weitaus häufigsten Molekül aller Zellen.

## POLYMERE HABEN MANCHMAL HELIXSTRUKTUR

Wir haben schon früher darauf hingewiesen, daß manche Polymere, wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren, regelmäßige lineare Skelette besitzen, in denen sich spezifische Gruppen (z.B.  $\text{CO}-\text{NH}-$ ) immer wiederholen.

Diese regelmäßig wiederkehrenden Gruppen sind häufig in Form einer Helix angeordnet, die durch schwache Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Die Helix ist eine natürliche Anordnung für regelmäßige lineare Polymere, da sie jedem Monomeren innerhalb des Moleküls die gleiche Orientierung gibt (Abbildung 4-13). Jedes Monomere geht daher die gleichen Wechselwirkungen ein. Wenn dagegen ein regelmäßiges, lineares, polymeres Molekül anders als helikal angeordnet ist, gehen verschiedene Monomere verschiedene sekundäre Wechselwirkungen ein. Ein instabiler Zustand tritt offensichtlich ein, wenn eine Gruppe sekundärer Wechselwirkungen viel stärker als eine andere ist. Die helikale Symmetrie ergibt sich daher nicht aus der spezifischen



**ABBILDUNG 4-13** Eine Polypeptidkette, die zu einer Helixkonfiguration, der sogenannten  $\alpha$ -Helix gefaltet ist. Alle Atome des Skeletts haben die gleiche Orientierung im Molekül. Man kann sie mit einer Wendeltreppe vergleichen, deren Stufen von Aminosäuren gebildet werden. Entlang der helikalen Achse liegt pro 1,5 Å eine Aminosäure. Der Abstand auf der Achse pro Umdrehung beträgt 5,4 Å, entsprechend 3,6 Aminosäuren pro Windung. Die Helix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylgruppe eines Restes und der Iminogruppe des viertnächsten Restes auf der Kette zusammengehalten. (Nach L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y., 1960, S. 500, mit Genehmigung).



Gestalt des Monomeren, sondern ist statt dessen die natürliche Folge einer einzigartigen Anordnung dieser Monomeren, die bei weitem stabiler als alle anderen Anordnungen ist.

Man muß sich dabei vor Augen halten, daß die meisten Biopolymeren keine regelmäßigen Polymeren sind, die aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Statt dessen haben sie häufig unregelmäßige Seitenketten, die an ein regelmäßiges Skelett gebunden sind. In so einem Fall (wie z.B. bei den Proteinen und Nukleinsäuren) müssen wir nicht notwendigerweise mit der Bildung einer Helix rechnen: eine 3-dimensionale Anordnung, die energetisch für die Gruppen im Skelett sehr günstig ist, führt häufig zu sehr ungünstigen Bindungen in den Seitenketten. Die 3-D-Gestalt vieler unregelmäßiger Polymerer ist daher ein Kompromiß zwischen dem Bestreben des regelmäßigen Skeletts, eine regelmäßige Helix zu bilden und der Tendenz der Seitenketten, dieses Skelett in eine Konfiguration zu pressen, die eine optimale Stärke der sekundären Wechselwirkungen der Seitenketten zuläßt.

### PROTEINSTRUKTUREN SIND IM ALLGEMEINEN UNREGELMÄSSIG

Im Fall der Proteine wird der Kompromiß zwischen Seitenketten und Skelett im allgemeinen zu Gunsten der Seitenkette entschieden. Wir werden auch im Kapitel 6 noch genauer sehen, daß aus diesem Grund die Aminosäuren in Proteinen nur selten Bestandteil regelmäßiger Helices sind. Das liegt daran, daß fast die Hälfte aller Aminosäuren unpolare Seitenketten tragen, die nur unter beträchtlichem Energieaufwand mit Wasser in Kontakt gebracht werden können. Dieses Ergebnis war ursprünglich für viele Chemiker überraschend, da sie davon ausgingen, daß die chemischen Gruppen des Skeletts starke Wasserstoffbrücken bilden können, wogegen unpolare Verbindungen nur die wesentlich schwächeren van der Waals-Bindungen eingehen können. Diese Überlegungen waren jedoch insofern irrig, als sie nicht in Betracht zogen, daß die Gruppen des polaren Skeletts fast genauso starke Wasserstoffbrücken mit Wasser eingehen können; außerdem ließen sie die fast ebenso wichtige Tatsache außer Acht, daß ein beträchtlicher Energieaufwand notwendig ist, um unpolare Gruppen in ein durch Wasserstoffbrücken stabilisiertes Gitter von Wassermolekülen zu zwingen.

Diese Überlegungen führten zu der interessanten Voraussage, daß in wäßrigen Lösungen Makromoleküle mit einer großen Zahl unpolarer Seitengruppen stabiler sein werden als solche, die hauptsächlich polare Gruppen enthalten. Wenn wir ein polares Molekül, das durch eine große Zahl interner Wasserstoffbrücken zusammengehalten wird, auffalten, ist die Abnahme der freien Energie oft nur klein, da die polaren Gruppen dann Wasserstoffbrücken mit Wasser eingehen können. Wenn wir andererseits ein Molekül

mit vielen unpolaren Gruppen auffalten, ist die Abnahme der freien Energie viel größer, da durch die Auffaltung notwendigerweise unpolare Gruppen in die wäßrige Umgebung gelangen.

## **DNA KANN EINE REGELMÄSSIGE HELIX BILDEN**

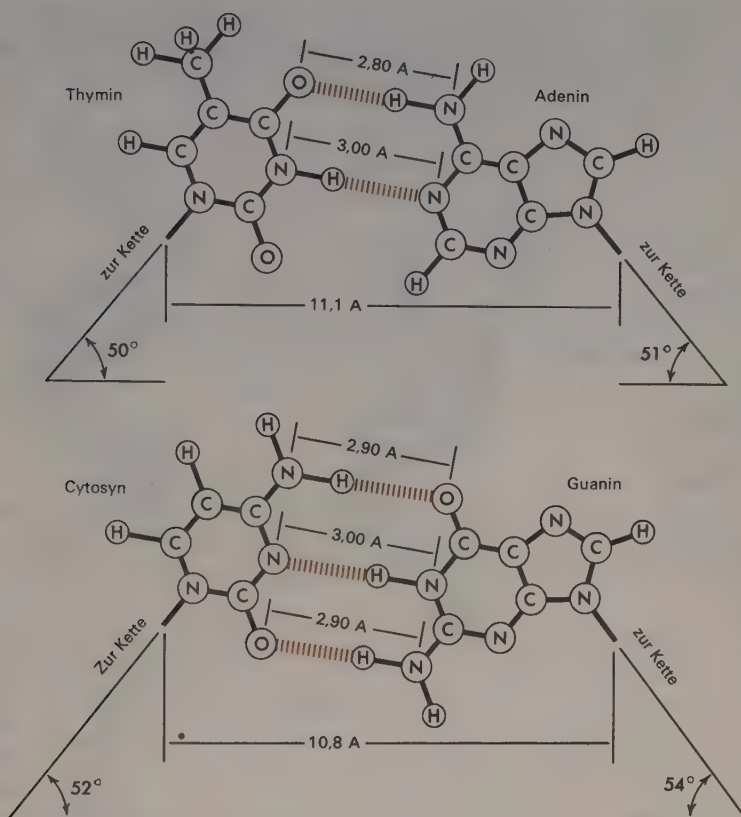
Auf den ersten Blick könnte man glauben, daß DNA noch viel weniger zur Ausbildung einer Helix geeignet ist als die unregelmäßig aufgebauten Proteine. In der DNA folgen nicht nur die Seitenketten unregelmäßig aufeinander, sie sind zusätzlich auch noch alle hydrophob. Sowohl die Purine (Adenin und Guanin) als auch die Pyrimidine (Thymin und Cytosin) sind, obwohl sie polare C=O und NH<sub>2</sub> Gruppen enthalten, ziemlich unlöslich in Wasser, da die Seiten ihrer flachen Ringe völlig hydrophob sind.

Trotzdem liegen DNA-Moleküle gewöhnlich als regelmäßige Helices vor, und zwar deshalb, weil die meisten DNA-Moleküle zwei Polynukleotidstränge mit komplementärer Struktur enthalten (nähere Details siehe Kapitel 9). Sowohl intramolekulare als auch intermolekulare schwache Wechselwirkungen stabilisieren die Struktur. Die beiden Stränge werden durch Wasserstoffbrücken zwischen Paaren komplementärer Purine und Pyrimidine zusammengehalten (Abbildung 4-14). Adenin ist durch eine Wasserstoffbrücke seiner Aminogruppe an die Ketogruppe von Thymin gebunden, wogegen Guanin (Ketogruppe) sich mit Cytosin (Aminogruppe) paart. Zusätzlich bilden fast alle Oberflächenatome der Zucker- und Phosphatreste Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen.

Die Basenpaare aus Purinen und Pyrimidinen liegen im Zentrum des DNA-Moleküls. Diese Anordnung ermöglicht eine Stapelung (Stacking) der aromatischen Ringe übereinander, wodurch der Kontakt mit Wasser begrenzt wird. Das «Stacking» wäre viel weniger effektiv, wenn nur ein Strang vorläge. Ein Einzelstrang könnte kein regelmäßiges Skelett haben, da die Pyrimidine kleiner als die Purine sind; der Winkel der Helixwindung müßte daher mit der Basensequenz variieren. Die komplementäre Basenpaarung in der Doppelhelix der DNA ermöglicht eine regelmäßige Struktur, da jedes Basenpaar die gleiche Größe hat.

## **DNA-MOLEKÜLE SIND BEI PHYSIOLOGISCHEN TEMPERATUREN STABIL**

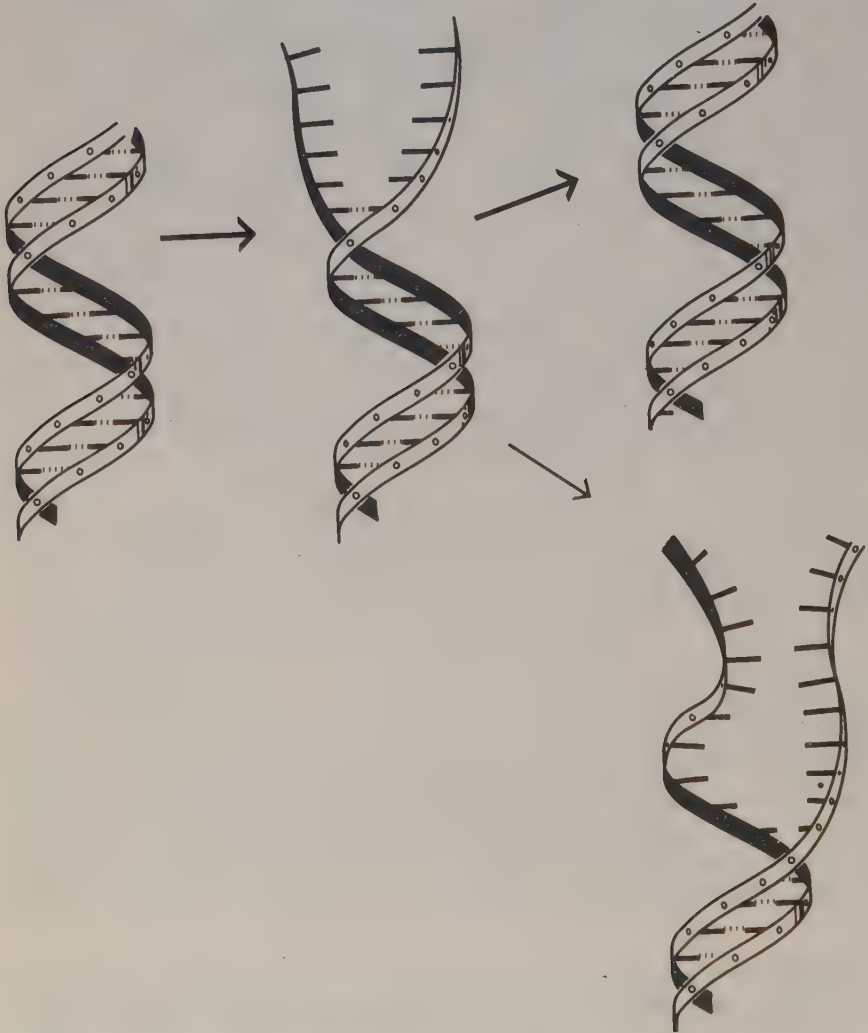
Die Doppelhelix der DNA ist aus zwei Gründen bei physiologischen Temperaturen sehr stabil. Erstens werden beim Aufbrechen der Doppelhelix die bestehenden Wasserstoffbrücken gespalten und die hydrophoben Purine und Pyrimidine in Kontakt mit Wasser gebracht. Zweitens liegt in jedem einzelnen



**ABBILDUNG 4-14** Über Wasserstoffbrücken verbundene Basenpaare in DNA. Adenin ist immer durch zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin verbunden, Guanin durch drei mit Cytosin. Die obligatorische Paarung der kleineren Pyrimidine mit den größeren Purinen gestattet den beiden Zucker-Phosphat-Skeletten, eine identische Helixkonfiguration anzunehmen. Alle Wasserstoff-Brückenbindungen beider Basenpaare sind starke Bindungen, da jedes Wasserstoffatom direkt auf sein Akzeptoratom hin (Stickstoff oder Sauerstoff) ausgerichtet ist.

DNA-Molekül eine große Zahl schwacher Wechselwirkungen vor, die so angeordnet sind, daß die meisten nicht ohne das gleichzeitige Aufbrechen vieler anderer solcher Bindungen gespalten werden können. Obwohl durch die thermische Bewegung ständig die Wasserstoffbrücken zwischen den endständigen Purin-Pyrimidinpaaren gespalten werden, fallen die beiden Stränge im allgemeinen nicht auseinander, da die Wasserstoff-Brückenbindungen in der Mitte intakt bleiben (Abbildung 4-15). Wenn eine Bruchstelle auftritt, ist der wahrscheinlichste nächste Schritt die Neubildung der gleichen Wasserstoff-

brücke, wobei die ursprüngliche Konfiguration des Moleküls wieder hergestellt wird. In manchen Fällen ist es natürlich auch möglich, daß dem ersten Bruch ein zweiter folgt usw. Solche mehrfachen Brüche sind aber ziemlich



**ABBILDUNG 4-15** Die Spaltung der endständigen Wasserstoff-Brückenbindungen der DNA durch zufällige thermische Bewegung. Da die im Inneren liegenden Wasserstoffbrücken die beiden Stränge weiter zusammenhalten, ist die sofortige Neubildung der gespaltenen sekundären Bindungen sehr wahrscheinlich. Hier wird auch die andere - sehr seltene - Möglichkeit gezeigt: das Aufbrechen weiterer Wasserstoffbrücken, das die Trennung der beiden Stränge zur Folge hat.



selten, sodaß doppelsträngige Helices, die von mehr als 10 Nukleotidpaaren zusammengehalten werden, bei Zimmertemperatur sehr stabil sind.

Das gleiche Prinzip gilt auch für die Stabilität der meisten Proteine. Die Gestalt stabiler Proteine ist niemals nur auf die Anwesenheit von ein oder zwei sekundären Bindungen zurückzuführen, sondern ist immer das Ergebnis des Zusammenwirkens einer größeren Zahl solcher Bindungen.

Geordnete Strukturen, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden, werden, wenn die Temperatur über physiologische Temperaturen hinausgeht, immer weniger stabil. Bei physiologisch ungewöhnlich hohen Temperaturen wird die gleichzeitige Spaltung mehrerer schwacher Wechselwirkungen häufiger. Nachdem eine bedeutende Anzahl solcher Bindungen gelöst wurde, verliert ein Molekül im allgemeinen seine ursprüngliche Gestalt (Denaturierung) und nimmt eine biologisch inaktive (denaturierte) Konfiguration an.

#### **DIE MEISTEN PROTEINMOLEKÜLE MITTLERER GRÖSSE UND FAST ALLE GROSSEN PROTEINMOLEKÜLE SIND AGGREGATE KLEINERER POLYPEPTIDKETTEN**

Wir haben schon früher darauf hingewiesen, wie die Erkenntnis, daß alle Makromoleküle Polymere sind, die aus kleinen regelmäßigen Monomeren wie z.B. den Aminosäuren aufgebaut sind, das Problem der Strukturaufklärung von Makromolekülen wesentlich erleichtert hat. Man weiß seit kurzem, daß die meisten großen Proteinmoleküle Aggregate kleiner Polypeptidketten sind, die je bis zu 400 Aminosäuren enthalten. Das Protein Ferritin z.B., das in Säugetieren Eisen speichert, hat ein Molekulargewicht von ca. 480.000. Es besteht jedoch nicht aus einer einzigen langen Polypeptidkette mit 4.000 Aminosäuren, sondern aus 20 identischen kleinen Polypeptiduntereinheiten, mit je ca. 200 Aminosäuren. Ebenso glaubte man ursprünglich, daß die Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus das ungeheuer große Molekulargewicht von 36 Millionen besäße. Glücklicherweise fand man später (siehe Kapitel 12), daß jedes TMV-Protein aus 2150 identischen Untereinheiten besteht, von denen jede aus 158 Aminosäuren aufgebaut ist. Sogar kleinere Proteine bestehen häufig aus einer Anzahl von Polypeptidketten. Hämoglobin, mit einem Molekulargewicht von nur 64.500, enthält 4 Polypeptidketten, 2  $\alpha$ -Ketten und 2  $\beta$ -Ketten. Jede einzelne dieser Ketten hat ein Molekulargewicht von ca. 16.000.

Wie bei den meisten anderen Proteinaggregaten werden in allen drei Fällen die kleinen Untereinheiten durch sekundäre Bindungen zusammengehalten. Diese Tatsache wird durch den Befund unterstützt, daß diese Proteinaggregate zerfallen, wenn man Reagenzien (wie z.B. Harnstoff) zusetzt, die

schwache Wechselwirkungen sprengen, kovalente Bindungen aber nicht beeinflussen. Schwache Wechselwirkungen sind jedoch nicht die einzigen Kräfte, die Makromoleküle zusammenhalten. In manchen Fällen, wie z.B. bei dem Protein Insulin, spielen Disulfidbrücken (S—S) zwischen Cysteinuntereinheiten ebenfalls eine Rolle.

## UNTEREINHEITEN SPAREN DER ZELLE ARBEIT

Sowohl der Aufbau von Polymeren aus Monomeren als auch die Verwendung polymerer Moleküle selbst als Untereinheiten für noch größere Aggregate, stellen ein allgemeines Bildungsprinzip für alle komplexen Strukturen - unbelebte wie auch belebte - dar. Dieses Prinzip besagt, daß es viel einfacher ist, die Auswirkung von Konstruktionsfehlern zu verringern, wenn man schon vor dem Einbau in das Endprodukt fehlerhafte Teile beseitigen kann. Man betrachte z.B. zwei verschiedene Möglichkeiten für den Aufbau eines Moleküls, das 1.000.000 Atome enthält. Nach Schema a) wird die Struktur Atom für Atom zusammengesetzt. Nach Schema b) werden zuerst 1.000 kleine Untereinheiten gebildet, jede aus 1.000 Atomen bestehend, die dann zu dem Endprodukt mit einer Million Atome zusammengesetzt werden. Nehmen wir an, daß während der Synthese zufällig Fehler auftreten, durch die mit einer Häufigkeit von  $10^{-5}$  ein falsches Atom eingesetzt wird. Nehmen wir weiter an, daß jeder Fehler zu einem funktionsunfähigen Produkt führt.

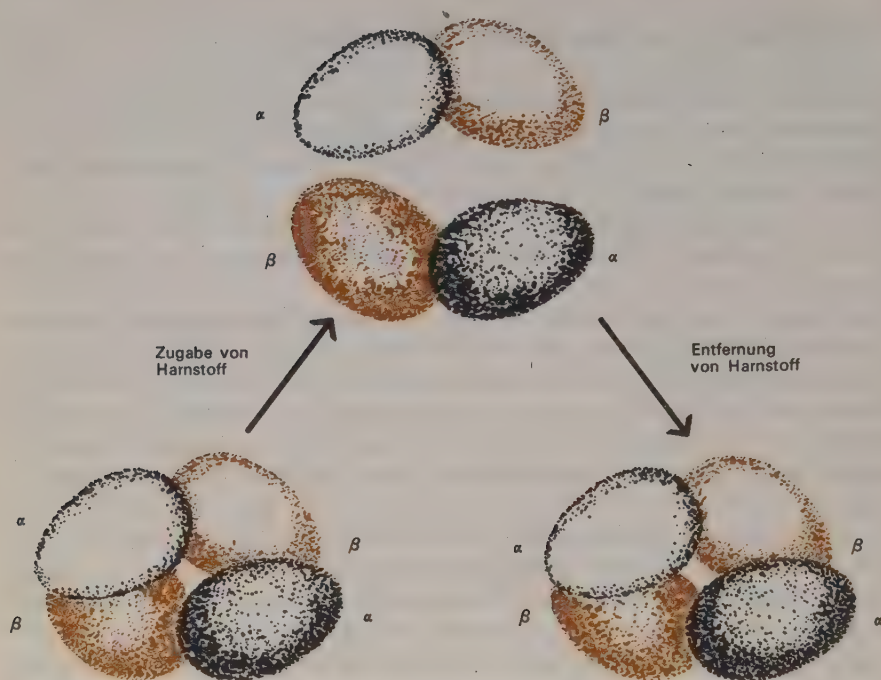
Nach Schema a) wird jedes Molekül durchschnittlich 10 falsche Atome enthalten und damit wird also praktisch kein funktionsfähiges Endprodukt entstehen. Nach Schema b) hingegen wird ein Fehler nur bei einem Prozent der Untereinheiten auftreten. Wenn ein Mechanismus zur Verfügung steht, der die fehlerhaften Untereinheiten eliminiert, können leicht gute Produkte geliefert werden und die Zelle wird durch die Anwesenheit von einem Prozent fehlerhafter Untereinheiten kaum gestört werden. Dieses Konzept liegt dem Fließband zugrunde, auf dem komplizierte Industrieprodukte wie Radios oder Autos gebaut werden. An jedem Punkt des Fließbandes gibt es einen Kontrollmechanismus, der schlechte Teile verwirft. Am industriellen Fließband wurden fehlerhafte Teilprodukte ursprünglich mit der Hand aussortiert; heute tritt vielfach eine automatische Kontrolle an Stelle der manuellen. In der Zelle werden die Fehler manchmal durch die Spezifität von Enzymen unter Kontrolle gehalten. Falls eine monomere Untereinheit Fehler aufweist, wird sie im allgemeinen vom Enzym, an dem das Polymere synthetisiert wird, nicht erkannt und daher nicht in das makromolekulare Endprodukt eingebaut. In anderen Fällen werden fehlerhafte Produkte deshalb nicht verwendet, weil sie sich nicht in ein stabiles Molekülaggregat einfügen können.

## DAS PRINZIP DER SPONTANEN AGGREGATION

$\Delta G$ -Werte von 1-5 kcal/Mol bedeuten nicht nur, daß einzelne schwache Wechselwirkungen spontan eingegangen werden, sondern auch, daß sich Strukturen, die durch mehrere solcher Wechselwirkungen zusammengehalten werden, spontan bilden. Eine instabile, ungefaltete Polypeptidkette neigt z.B. dazu, infolge thermischer Bewegung eine große Reihe zufälliger Konfigurationen anzunehmen. Die meisten davon sind thermodynamisch instabil. Die thermische Bewegung wird aber notwendigerweise auch Gruppen zusammenbringen, die miteinander gute schwache Wechselwirkungen eingehen können. Diese Gruppen neigen dazu, beieinander zu bleiben, da bei ihrer Bildung mehr freie Energie abgegeben wird als bei ihrer Auflösung zurückgewonnen werden kann. Durch eine Reihe zufälliger Bewegungen wird also die Polypeptidkette nach und nach eine Konfiguration annehmen, bei der die meisten oder sogar alle Atome eine festgelegte Position im Molekülverband einnehmen.

Die Aggregation selbständiger Moleküle ist ebenfalls spontan. Hämoglobin ist ein gutes Beispiel dafür (Abbildung 4-16). Es kann durch Zugabe von Reagenzien wie Harnstoff, die sekundäre Bindungen spalten, in zwei Molekülhälften mit einem Molekulargewicht von 32.000 dissoziieren. Wenn man jedoch den Harnstoff wieder entfernt, lagern sich die Molekülhälften rasch wieder aneinander und geben wieder ein funktionsfähiges Hämoglobinmolekül. Die Oberflächenstruktur der beiden Molekülhälften ist hoch spezifisch; sie reagieren nur miteinander und mit keinen anderen zelleigenen Molekülen.

Das gleiche allgemeine Prinzip der spontanen Aggregation beherrscht auch den Aufbau wesentlich größerer und komplizierterer Strukturen, wie Zellwand und Zellmembran. Beide sind mosaikartige Oberflächenstrukturen, die aus einer Vielzahl verschiedener Moleküle bestehen, einige hochmolekular wie Proteine, andere bedeutend kleiner, wie Lipide. Wir wissen heute noch fast gar nichts über die genaue Anordnung der Moleküle in diesen großen und komplizierten Strukturen. Trotzdem kann man mit gutem Grund annehmen, daß die beteiligten Moleküle nur mit anderen Molekülen der Zellmembran (oder Zellwand) stabile Kontakte bilden können. Man kann sich das im Fall der Lipide leicht veranschaulichen, da sie wegen der langen unpolaren Kohlenwasserstoffketten in Wasser äußerst unlöslich sind. Neu synthetisierte Lipide binden sich infolge der möglichen van der Waals-Kräfte bevorzugt an andere Lipide in der Zellwand oder Zellmembran und wandern nicht in andere, mehr polare Regionen, wie z.B. das wäßrige (polare) Zellinnere.



**ABBILDUNG 4-16** Bildung eines aktiven Hämoglobinmoleküls aus zwei Molekülhälften. Jedes Hämoglobinmolekül enthält zwei α-Ketten und zwei β-Ketten. In Harnstoff, der zur Lösung schwacher Wechselwirkungen führt, zerfällt das ursprüngliche Molekül in zwei Hälften, die je eine α-Kette und eine β-Kette enthalten. Wird der Harnstoff wieder entfernt, lagern sich die beiden Teile wieder zu vollständigen Molekülen zusammen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Viele bedeutende Vorgänge innerhalb einer Zelle laufen ohne Bildung oder Spaltung kovalenter Bindungen ab. Die Lokalisierung der meisten Moleküle in einer Zelle hängt von den bestehenden schwachen (sekundären) Anziehungs- oder Abstoßungskräften ab. Schwache Wechselwirkungen sind außerdem für die Gestalt von Molekülen, insbesondere von Makromolekülen, bestimmend. Die wichtigsten schwachen Wechselwirkungen sind: Wasserstoff-Brückenbindungen, van der Waals-Kräfte und ionische Bindungen. Obwohl diese Kräfte relativ schwach sind, sind sie doch groß genug, um zu garantieren, daß die richtigen Moleküle (Gruppen) miteinander reagieren. Z.B. ist die Oberfläche eines Enzyms so gestaltet, daß es spezifisch sein Substrat anzieht.

Die Bildung aller chemischen Bindungen, schwacher Wechselwirkungen



ebenso wie starker kovalenter Bindungen, gehorcht den Gesetzen der Thermodynamik. Eine Bindung wird dann gebildet, wenn dabei die freie Energie abnimmt ( $\Delta G$  negativ). Die gleiche Menge an freier Energie muß zur Verfügung gestellt werden, wenn man die Bindung spalten will. Die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Atomen ist im allgemeinen von einem stärker negativen  $\Delta G$  begleitet; kovalente Bindungen lösen sich daher fast nie spontan. Im Gegensatz dazu sind die  $\Delta G$ -Werte, die im Zusammenhang mit sekundären Bindungen auftreten, nur wenige Male größer als die durchschnittliche thermische Energie der Moleküle bei physiologischen Temperaturen. Einzelne schwache Wechselwirkungen werden daher in lebenden Zellen leicht eingegangen und wieder aufgelöst.

Moleküle die polare (geladene) Gruppen enthalten, zeigen andere schwache Wechselwirkungen als unpolare Moleküle, in welchen die Ladungsverteilung symmetrisch ist. Polare Moleküle bilden gute Wasserstoff-Brückenbindungen, unpolare können dagegen nur van der Waals-Bindungen eingehen. Das wichtigste polare Molekül ist Wasser. Jedes Wassermolekül kann vier starke Wasserstoff-Brückenbindungen zu anderen Wassermolekülen bilden. Polare Moleküle sind (in verschiedenem Ausmaß) wasserlöslich, unpolare hingegen nicht, da sie keine Wasserstoffbrücken zu den Wassermolekülen bilden können.

Jede Molekülart hat eine für sie spezifische Gestalt, welche die Anzahl der Moleküle, mit denen sie gute sekundäre Bindungen eingehen kann, beschränkt. Starke sekundäre Wechselwirkungen erfordern sowohl eine komplementäre Beziehung der beiden bindenden Oberflächen (Schlüssel-Schloß-Beziehung), als auch die Beteiligung vieler Atome. Obwohl Moleküle, die nur über eine oder zwei schwache Wechselwirkungen miteinander verbunden sind, häufig auseinanderfallen, kann eine Ansammlung mehrerer schwacher Wechselwirkungen jedoch zu einem stabilen Molekülaggregat führen. Die Tatsache, daß doppelsträngige DNA nie spontan auseinanderfällt, beweist, daß solche Aggregate außerordentlich stabil sein können. Die Bildung diese Aggregate kann spontan erfolgen, wobei sich schrittweise die richtigen Bindungen bilden (Prinzip der spontanen Selbst-Aggregation).

Die Gestalt von polymeren Molekülen wird von sekundären Bindungen bestimmt. Alle biologischen Polymere enthalten Einfachbindungen, um die eine freie Rotation möglich ist. Trotzdem kommen sie nicht, wie man erwarten könnte, in vielen verschiedenen Konfigurationen vor, da die Bildung einer der vielen möglichen Konfigurationen mit einer maximalen Abnahme der freien Energie verbunden ist. Daher wird ausschließlich diese energetisch bevorzugte Konfiguration gebildet. Einige polymere Moleküle haben ein regelmäßiges helikales Skelett, das durch eine Reihe regelmäßiger, interner sekundärer Bindungen zwischen den chemischen Gruppen des Skeletts zusammengehalten wird. Eine regelmäßige Helix kann sich jedoch dann nicht bilden, wenn dadurch die jeweiligen Seitenketten so angeordnet werden, daß sie keine energetisch günstigen

schwachen Wechselwirkungen mehr eingehen können. Das ist bei vielen Proteinen der Fall, bei denen die unregelmäßige Verteilung der unpolaren Seitenketten das Skelett zu einer äußerst unregelmäßigen Konformation zwingt, die die Bildung von van der Waals-Bindungen zwischen den unpolaren Gruppen ermöglicht. Eine unregelmäßige Verteilung von Seitenketten verhindert jedoch nicht immer die Bildung einer Helixstruktur. Im DNA-Molekül erlaubt z.B. die spezifische Basenpaarung zwischen Purinen und Pyrimidinen in einer Doppelhelix ein «Stacking» (Übereinanderstapelung) der unpolaren aromatischen Gruppen im Zentrum des Moleküls.

## LITERATUR

- Lehninger, A. L., *Bioenergetics*, Benjamin, New York, 1965. Die ersten Kapitel geben eine kurzgefaßte Beschreibung der Gesetze der Thermodynamik für weniger fortgeschrittene Biologiestudenten.
- Blum, H. F., *Time's Arrow and Evolution*, Princeton University Press, Princeton, N. J., 1951. In Kapitel 3 finden wir eine ungewöhnlich klare Einleitung in die Thermodynamik, anwendbar für biologische Systeme.
- Klotz, I. M., *Some Principles of Energetics in Biochemical Reactions*, Academic, New York, 1957. Eine Besprechung thermodynamischer Fragen im Zusammenhang mit biochemischen Reaktionen. Für Fortgeschrittene.
- Pauling, L., *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1960. Einer der großen Klassiker der chemischen Literatur; eine Abhandlung über die Strukturchemie mit Betonung der Wasserstoff-Brückenbindungen.
- Haggis, G. H., D. Michie, A. R. Muir, K. B. Roberts und P. M. B. Walker, *Introduction to Molecular Biology*, Wiley, New York, 1964. Ein Buch für die ersten Semester, in dem besonderer Wert auf die Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Makromolekülen gelegt wird.

# 5

## GEKOPPELTE REAKTIONEN UND GRUPPENÜBER- TRAGUNGEN

Im letzten Kapitel haben wir die Bildung schwacher Wechselwirkungen vom Standpunkt der Thermodynamik aus betrachtet. Für jede mögliche sekundäre Bindung wurde die Frage gestellt, ob bei ihrer Bildung freie Energie gewonnen wird oder verloren geht, da das thermodynamische Gleichgewicht nur bei einem negativen  $\Delta G$  eine Bindungsbildung begünstigt. Man kann für kovalente Bindungen die gleichen Betrachtungen anstellen. Die Beteiligung von Enzymen an der Bildung und Spaltung kovalenter Bindungen ändert nichts an der Tatsache, daß  $\Delta G$  negativ sein muß.

Bei oberflächlicher Betrachtung scheinen jedoch viele der wichtigsten kovalenten Bindungen einer Zelle unter Verstoß gegen thermodynamische Gesetze gebildet zu werden, vor allem diejenigen, welche kleine Moleküle zu großen, polymeren Molekülen verknüpfen. Bei Bildung dieser Bindungen kommt es zu einer Zunahme der freien Energie. Ursprünglich wurde daher manchmal die Ansicht vertreten, daß die Zelle die besondere Fähigkeit besitze, gegen Gesetze der Thermodynamik zu verstoßen und daß gerade darauf das «Geheimnis des Lebens» beruhe.

Es steht heute jedoch fest, daß diese biosynthetischen Vorgänge nicht gegen die thermodynamischen Gesetze verstoßen, sondern daß sie auf anderen Reaktionen beruhen als den ursprünglich postulierten. So werden Nukleinsäuren nicht durch Kondensation von Nukleosidphosphaten gebildet; Glykogen wird nicht direkt aus Glucose gebildet; Proteine nicht durch Ver-

knüpfung von Aminosäuren. Statt dessen werden die monomeren Vorstufen unter Verwendung von Energie aus ATP zuerst in energiereiche «aktivierte» Vorstufen umgewandelt, die sich dann spontan (mit Hilfe spezifischer Enzyme) zu Makromolekülen vereinigen. In diesem Kapitel werden wir diese Gedankengänge weiter erläutern, wobei wir uns besonders auf die Thermodynamik der Peptid-(Protein) und Phosphodiesterbindung (Nukleinsäuren) konzentrieren wollen. Zuerst müssen wir uns jedoch kurz mit einigen allgemeinen thermodynamischen Eigenschaften kovalenter Bindungen beschäftigen.

### NÄHRSTOFFMOLEKÜLE SIND THERMODYNAMISCH INSTABIL

Der Gehalt an freier Energie kann zwischen verschiedenen Molekülen stark variieren. Dies folgt aus der Tatsache, daß nicht alle kovalenten Bindungen die gleiche Bindungsenergie enthalten. So ist z.B. die kovalente Bindung zwischen Sauerstoff und Wasserstoff wesentlich stärker als die zwischen Wasserstoff und Wasserstoff oder Sauerstoff und Sauerstoff. Bei der Bildung einer O-H-Bindung unter Spaltung einer O-O- und einer H-H-Bindung wird deshalb Energie abgegeben. Aus energetischen Überlegungen wissen wir also, daß ein Gemisch aus Sauerstoff und Wasserstoff bei ausreichender Konzentration in Wasser umgewandelt wird.

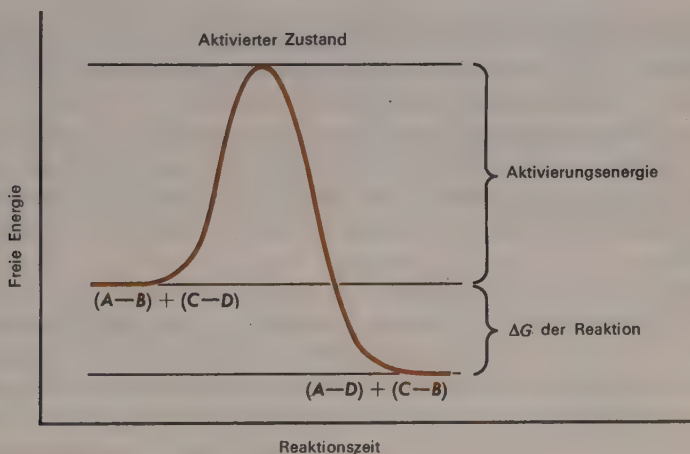
Ein Molekül enthält also mehr freie Energie, wenn es durch schwache kovalente Bindungen anstatt durch starke Bindungen zusammengehalten wird. Das klingt zuerst paradox, da es bedeutet, daß eine Bindung umso weniger Energie abgeben kann, je stärker sie ist. Diese Aussage wird jedoch sofort sinnvoll, wenn man sich überlegt, daß ein Atom, das an einer sehr starken Bindung beteiligt ist, bereits beim Prozeß der Bindungsbildung eine größere Menge an Energie abgegeben hat. Aus diesem Grund sind die besten Nährstoffmoleküle (die am meisten Energie liefern) diejenigen, die schwache kovalente Bindungen enthalten und daher thermodynamisch weniger stabil sind.

So ist z.B. Glucose ein ausgezeichnetes Nährstoffmolekül, da die freie Energie des Moleküls stark abnimmt, wenn es durch Sauerstoff zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxydiert wird.  $\text{CO}_2$  ist dagegen für Tiere kein Nahrungsmolekül, da es ohne energielieferndes ATP nicht spontan in komplexere organische Moleküle umgewandelt werden kann, selbst nicht mit Hilfe spezifischer Enzyme.  $\text{CO}_2$  kann von Pflanzen nur deshalb als primäre Kohlenstoffquelle herangezogen werden, weil die Energie der Lichtquanten bei der Photosynthese zur Bildung von ATP führt.



## UNTERSCHIEDUNG ZWISCHEN RICHTUNG UND GESCHWINDIGKEIT EINER REAKTION

Chemische Reaktionen, durch die Moleküle in andere umgewandelt werden, die einen geringeren Energieinhalt haben, laufen bei physiologischen Temperaturen ohne Katalysator mit sehr geringen Geschwindigkeiten ab. Das liegt daran, daß sogar eine schwache kovalente Bindung tatsächlich sehr stark ist und durch thermische Bewegung innerhalb einer Zelle kaum je gespalten wird. Will man eine chemische Bindung in Abwesenheit eines Katalysators spalten, muß Energie zugeführt werden, um die gebundenen Atome voneinander zu entfernen. Wenn die Atome einer Bindung teilweise voneinander getrennt sind, können sie mit frischen Partnern neue, festere Bindungen eingehen. Die freigesetzte Energie für die Gesamtreaktion ist die Summe aus der freien Energie, die für die Spaltung der ursprünglichen Bindung benötigt wurde und der Differenz der Bildungsenergie zwischen den ursprünglichen und den neugeformten Bindungen (Abbildung 5-1).

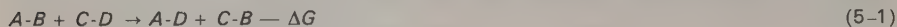


**ABBILDUNG 5-1** Die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion:  $(A-B) + (C-D) \rightarrow (A-D) + (C-B)$ .

Die Energie, die zugeführt werden muß, um die ursprüngliche kovalente Bindung bei einer Molekülumwandlung zu spalten, nennt man Aktivierungsenergie. Die Aktivierungsenergie ist im allgemeinen geringer als die ursprüngliche Bindungsenergie, da bei Umwandlungen meistens keine völlig freien Atome entstehen. Statt dessen muß es zu einem Zusammenstoß zwischen den beiden reagierenden Molekülen kommen, dem die vorübergehende Bil-

derung eines Molekülkomplexes folgt (des aktivierten Zustandes). Im aktivierten Zustand führt die große Annäherung der beiden Moleküle zu einer gegenseitigen Lockerung der Bindungen, sodaß weniger Energie benötigt wird, um eine Bindung zu spalten als wenn die Bindung einem isolierten Molekül angehörte.

Die meisten Reaktionen kovalenter Bindungen in einer Zelle können daher durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Die Massenwirkungsgleichung für diese Reaktion lautet

$$K_{\text{äqu}} = \frac{[A-D] \times [C-B]}{[A-B] \times [C-D]} \quad (5-2)$$

wobei [A-B], [C-D], etc. die Konzentrationen der verschiedenen, reagierenden Moleküle in Mol/Liter bedeuten. Die Beziehung zwischen dem Wert von  $K_{\text{äqu}}$  und  $\Delta G$  ist wieder durch Gleichung 4-4 gegeben.

Da Aktivierungsenergien im allgemeinen zwischen 20 und 30 kcal/Mol liegen, kommt es bei physiologischen Temperaturen praktisch kaum zur Bildung aktivierter Zustände. Man kann daher hohe Aktivierungsenergien als Schranken für die spontane Umwandlung zellulärer kovalenter Bindungen betrachten.

Diese Schranken sind ungeheuer wichtig. Wenn es sie nicht gäbe, wäre Leben unmöglich, da alle Atome im Zustand der geringsten Energie vorliegen würden. Es gäbe keine Möglichkeit, Energie zeitweilig für künftige Arbeitsleistungen zu speichern. Andererseits wäre Leben aber auch dann unmöglich, wenn es nicht Mittel gäbe, die Aktivierungsenergie bestimmter spezifischer Reaktionen selektiv herunterzusetzen. Diese Möglichkeit muß auch bestehen, damit das Zellwachstum mit genügender Geschwindigkeit vor sich gehen kann, sonst könnte es ganz beträchtlich durch zufällige Zerstörungskräfte wie ionisierende oder ultraviolette Strahlung beeinträchtigt werden.

## ENZYME SETZEN DIE AKTIVIERUNGSENERGIE HERAB

Enzyme sind für das Leben unumgänglich notwendig, da sie die Aktivierungsenergie herabsetzen. Die Aufgabe von Enzymen ist es, chemische Reaktionen zu beschleunigen, die für die Existenz der Zelle notwendig sind.

Diese Aufgabe erfüllen sie, indem sie die Aktivierungsenergie molekularer Umwandlungen so weit herabsetzen, daß sie durch die Energie der thermischen Bewegung aufgebracht werden kann. Wenn ein spezifisches Enzym vorhanden ist, gibt es keine wirksame Schranke mehr für die rasche Bildung von Reaktionsprodukten mit dem niedrigsten Energieinhalt. Enzyme beeinflussen niemals die Lage eines Gleichgewichts: sie erhöhen nur die Geschwindigkeit, mit der es erreicht wird. Wenn daher das thermodynamische Gleichgewicht für die Bildung eines Moleküls ungünstig ist, kann auch ein Enzym nicht zur Anhäufung dieser Verbindung führen.

Da Enzyme für die Katalyse praktisch aller zellulären Molekülumwandlungen gebraucht werden, können wir auch bei Kenntnis der freien Energie verschiedener Moleküle nicht sagen, ob eine energetisch mögliche Reaktion auch wirklich eintreten wird. Man muß dabei immer die Reaktionsgeschwindigkeit berücksichtigen. Nur wenn die Zelle ein geeignetes Enzym besitzt, wird die zugehörige Reaktion eine wichtige Rolle spielen.

## STOFFWECHSELVORGÄNGE SIND DURCH ABNAHME DER FREIEN ENERGIE GEKENNZEICHNET

Wir wissen aus der Thermodynamik, daß alle biochemischen Stoffwechselwege mit einer Abnahme an freier Energie einhergehen müssen. Das trifft offensichtlich für Abbauprozesse zu, in deren Verlauf thermodynamisch weniger stabile Nährstoffmoleküle in stabilere Verbindungen umgewandelt werden, wie z.B.  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ , wobei Wärme frei wird. Alle Abbauprozesse verfolgen zwei wichtige Ziele: 1) die kleinen organischen Bruchstücke zu liefern, die als Bausteine für größere organische Moleküle notwendig sind und 2) einen beträchtlichen Teil der freien Energie der ursprünglichen Nährstoffmoleküle in einer Form zu speichern, die Arbeit leisten kann. Zu diesem Zweck werden einige Schritte der Abbaureaktionen mit der gleichzeitigen Bildung von Molekülen gekoppelt, die freie Energie speichern können (energiereiche Verbindungen, z.B. ATP).

Es wird nicht die gesamte freie Energie aus den Nährstoffmolekülen in freie Energie energiereicher Verbindungen umgewandelt.

Wäre das der Fall, würde beim Abbauprozess die freie Energie nicht abnehmen. Es gäbe keine treibende Kraft für den Abbau von Nährstoffmolekülen. Man findet statt dessen, daß im Verlauf der Abbauprozesse mindestens die Hälfte der freien Energie der Nährstoffmoleküle in Wärme oder Entropie umgewandelt wird. Man nimmt z.B. heute an, daß in Zellen ungefähr 40% des Energieinhaltes der Glucose für die Bildung energiereicher Verbindungen aufgewendet wird, der Rest wird in Wärmeenergie und Entropie umgewandelt.

**BEI DER HYDROLYSE ENERGIEREICHER BINDUNGEN IST  $\Delta G$  STARK NEGATIV**

Energierreiche Verbindungen enthalten eine oder mehrere Bindungen, deren Spaltung durch Wasser (Hydrolyse) von einer starken Abnahme freier Energie begleitet ist (5 kcal/Mol oder mehr). Die spezifischen Bindungen, deren Hydrolyse diese stark negativen  $\Delta G$ -Werte liefern, werden energiereiche Bindungen genannt. Beide Ausdrücke sind eigentlich verwirrend, da ja nicht die Bindungsenergie sondern die freie Energie der Hydrolyse groß ist. Trotzdem wird der Ausdruck allgemein verwendet und wir werden aus praktischen Gründen die Konvention beibehalten und energiereiche Bindungen durch das Symbol ~ kennzeichnen.

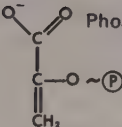
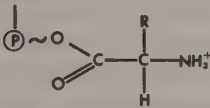
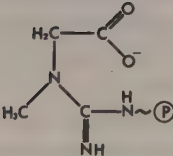
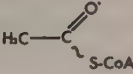
Die Energie der Hydrolyse einer durchschnittlichen energiereichen Bindung (7 kcal/Mol) ist wesentlich kleiner als die, die freigesetzt wird, wenn man Glucose in einem Schritt völlig abbaut (688 kcal/Mol.). Der einstufige Abbau der Glucose wäre jedoch für die Bildung energiereicher Bindungen ungeeignet. Das ist zweifellos der Grund, warum der Glucoseabbau in biologischen Systemen so viele Schritte erfordert. Dadurch wird die Energie, die in jedem Schritt freigesetzt wird, größenordnungsmäßig gleich der der Hydrolyse einer energiereichen Bindung.

Die wichtigste energiereiche Verbindung ist ATP. Es wird aus anorganischem Phosphat  $\text{P}$  und ADP gebildet, wobei die Energie entweder aus Abbaureaktionen (einige davon sind in Kapitel 2 und 3 angeführt) oder von der Sonne (Photosynthese) geliefert wird. Es gibt jedoch noch viele andere wichtige energiereiche Verbindungen. Einige werden direkt durch Abbaureaktionen gebildet, andere entstehen unter teilweiser Verwendung der freien Energie des ATP. In Tabelle 5 sind die wichtigsten Typen energiereicher Bindungen angeführt. An allen sind entweder Phosphor- oder Schwefelbindungen beteiligt. Die energiereichen Pyrophosphatbindungen des ATP entstehen durch die Vereinigung von Phosphatgruppen. Die Pyrophosphatbindung  $\text{P} \sim \text{P}$  ist jedoch nicht die einzige energiereiche Phosphatbindung: durch Verknüpfung einer Phosphatgruppe mit dem Sauerstoff einer Carboxylgruppe entsteht eine energiereiche Acylbindung. Man weiß heute auch, daß energiereiche Bindungen, an denen Schwefel beteiligt ist, eine fast ebenso bedeutende Rolle im Stoffwechsel spielen wie die energiereichen Phosphatbindungen. Das wichtigste Molekül mit einer energiereichen Schwefelbindung ist Acetyl-CoA. Diese Bindung dient als hauptsächliche Energiequelle bei der Biosynthese der Fettsäuren.

Da das  $\Delta G$  energiereicher Bindungen in weiten Grenzen variiert (Tabelle 5-1), ist die Bezeichnung energiereich manchmal etwas willkürlich. Als Kriterium gilt meistens, ob die Hydrolyse mit einer anderen Reaktion gekoppelt werden und dadurch einen wichtigen Biosyntheseschritt ermöglichen kann. So ist z.B. das negative  $\Delta G$  der Hydrolyse von Glucose-6- $\text{P}$  3 bis 4 kcal/Mol.



TABELLE 5-1. Wichtige Klassen energiereicher Bindungen.

Klasse	Molekülbeispiel	$\Delta G$ der Reaktion kcal/Mol
Pyrophosphat	$\text{P} \sim \text{P}$ Pyrophosphat	$\text{P} \sim \text{P} \rightleftharpoons \text{P} + \text{P} \quad \Delta G = -6$
Nukleosid diphosphat	Adenosin — $\text{P} \sim \text{P}$ (ADP)	$\text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{P} \quad \Delta G = -6$
Nukleosid triphosphat	Adenosin — $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$ (ATP)	$\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P} \quad \Delta G = -7$ $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{P} \sim \text{P} \quad \Delta G = -8$
Enolphosphat	 Phosphoenol-pyruvat (PEP)	$\text{PEP} \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{P} \quad \Delta G = -12$
Aminoacyl-adenylat	Adenosin 	$\text{AMP} \sim \text{AS} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{AS} \quad \Delta G = -7$
Guanidin-phosphat	 Kreatinphosphat	$\text{Kreatin} \sim \text{P} \rightleftharpoons \text{Kreatin} + \text{P} \quad \Delta G = -8$
Thioester	 Acetyl-CoA	$\text{Acetyl-CoA} \rightleftharpoons \text{CoA-SH} + \text{Acetat} \quad G = -8$

Das reicht nicht für die Knüpfung einer Peptidbindung aus; man zählt daher diese Phosphatesterbindung nicht zu den energiereichen Bindungen.

## ENERGIEREICHE BINDUNGEN SIND FÜR BIOSYNTHESESCHRITTE NOTWENDIG

Die Synthese eines großen Moleküls aus kleinen Untereinheiten erfordert häufig einen gewissen Energieaufwand. Ein Biosyntheseschritt könnte jedoch, genauso wie ein Abbauprozess, nicht ablaufen, wenn er nicht insgesamt von einer netto Abnahme freier Energie begleitet wäre. Daraus folgt, daß viele Biosynthesewege eine äußere Energiequelle benötigen. Die energiereichen Verbindungen stellen solche Energiequellen dar. Die Knüpfung vieler Bindungen während der Biosynthese einer Verbindung ist mit der Spaltung einer energiereichen Bindung gekoppelt, sodaß die Änderung der freien Energie immer negativ ist. Energiereiche Bindungen sind daher in der Zelle meistens nur sehr kurzlebig. Fast unmittelbar nachdem sie im Verlauf eines Abbauprozesses gebildet wurden, werden sie enzymatisch wieder abgebaut, wobei die Energie frei wird, die für den vollständigen Ablauf einer anderen Reaktion notwendig ist.

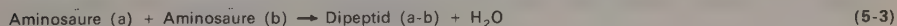
Nicht alle Schritte eines Biosyntheseweges erfordern die gleichzeitige Beteiligung einer energiereichen Bindung. Häufig ist sie nur für einen oder zwei Schritte notwendig. Manchmal begünstigt das  $\Delta G$  der Reaktion auch ohne zugesetzte, energiereiche Bindungen den Reaktionsverlauf in Richtung der Biosynthese. In anderen Fällen ist  $\Delta G$  praktisch Null oder sogar schwach positiv. Diese schwach positiven  $\Delta G$ -Werte spielen jedoch keine Rolle, solange sie von der Hydrolyse einer energiereichen Bindung gefolgt werden. Wichtig ist nämlich die Summe aller Änderungen der freien Energie eines Stoffwechselvorganges. Es macht nicht so viel aus, wenn das  $K_{\text{äqu}}$  eines spezifischen Biosyntheseschrittes leicht auf Seiten der Abbaureaktion liegt (80 : 20), solange das  $K_{\text{äqu}}$  des nachfolgenden Schrittes im Verhältnis 100 : 1 die Vorwärtsreaktion der Biosynthese begünstigt.

Entsprechend werden auch nicht bei allen Schritten des Abbauprozesses energiereiche Bindungen gebildet. So liefern nur zwei Schritte des vielstufigen glykolytischen Glucoseabbaus (Embden-Meyerhof-Schema) ATP. Außerdem gibt es noch etliche Abbauprozesse, die einen oder mehrere Schritte enthalten, die sogar die Hydrolyse einer energiereichen Bindung erfordern. Auch dafür ist der glykolytische Abbau der Glucose ein Beispiel. Er verbraucht 2 Moleküle ATP für je 4, die gebildet werden. Es müssen natürlich auch hier, wie bei jedem energieliefernden Abbauprozess, mehr energiereiche Bindungen gebildet als gespalten werden.

## PEPTIDBINDUNGEN HYDROLISIEREN SPONTAN

Die Bildung eines Dipeptids aus zwei Aminosäuren unter Abspaltung von Wasser erfordert ein  $\Delta G$  von 1-4 kcal/Mol, je nachdem, welche Aminosäuren verknüpft werden. Die  $\Delta G$ -Werte werden zunehmend kleiner wenn Aminosäuren an länger werdende Polypeptidketten gebunden werden; für eine unendlich lange Kette beträgt  $\Delta G$  nur  $\sim 0,5$  kcal/Mol. Diese Abnahme beruht auf der Tatsache, daß die freien, geladenen  $\text{NH}_3^+$  und  $\text{COO}^-$  Gruppen an den Kettenenden die Hydrolyse (Spaltung unter Aufnahme eines Moleküls Wasser) der benachbarten Peptidbindungen begünstigen.

Die positiven  $\Delta G$ -Werte zeigen bereits, daß Polypeptidketten sich nicht aus freien Aminosäuren bilden können. Zusätzlich müssen wir noch berücksichtigen, daß Wasser eine viel, viel höhere Konzentration (gewöhnlich  $> 100$ ) hat als irgendwelche andere zelluläre Moleküle. Alle Gleichgewichtsreaktionen, an denen Wasser beteiligt ist, werden daher bevorzugt in die Richtung verschoben, in der Wasser verbraucht wird. Man kann das leicht aus der Definition der Gleichgewichtskonstanten entnehmen. Z.B. entspricht der Reaktion, bei der ein Dipeptid gebildet wird



folgende Gleichgewichtskonstante

$$K_{\text{äqu}} = \frac{[a] \times [b]}{[a-b] \times [\text{H}_2\text{O}]} \quad (5-4)$$

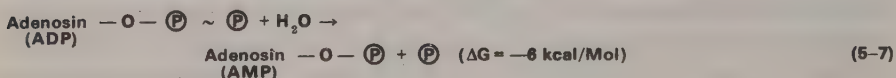
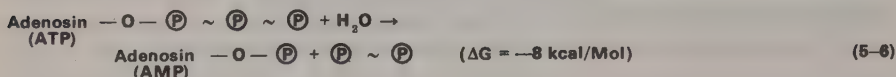
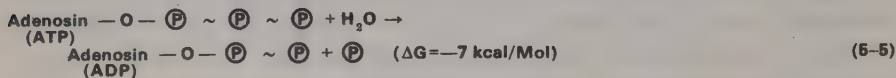
wobei die Konzentrationen in Mol/Liter gegeben sind. Für ein gegebenes  $K_{\text{äqu}}$  (das mit  $\Delta G$  über die Formel  $G = -RT \ln K$  verbunden ist) bedeutet daher eine größere Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}$  eine entsprechend geringere Konzentration des Dipeptids. Die relativen Konzentrationen sind daher sehr wichtig. Schon eine einfache Rechnung zeigt, daß die Hydrolyse spontan verlaufen kann, wenn  $\Delta G$  für die Synthesereaktion  $-3$  kcal/Mol beträgt.

Theoretisch sind Proteine daher instabil und zerfallen nach einiger Zeit spontan in die Aminosäureuntereinheiten. In Abwesenheit von spezifischen Enzymen sind die Geschwindigkeiten dieser freiwillig ablaufenden Reaktionen aber viel zu klein, um einen merklichen Effekt auf den Zellstoffwechsel zu haben. Das bedeutet, daß ein einmal gebildetes Protein stabil ist, wenn sein Zerfall nicht durch spezifische Enzyme katalysiert wird.

## KOPPLUNG VON NEGATIVEN UND POSITIVEN $\Delta G$ -WERTEN

Man muß Aminosäuren freie Energie zuführen, damit sie zu Proteinen verknüpft werden. Wie das vor sich geht, wurde klar, als die fundamentale

Bedeutung von ATP als Energielieferant erkannt wurde. ATP enthält drei Phosphatgruppen, die an ein Adenosinmolekül gebunden sind (Adenosin —O—P ~ P ~ P). Wenn eine oder zwei der beiden endständigen ~P Gruppen durch Hydrolyse abgespalten werden, nimmt die freie Energie ab.



Alle diese Abbaureaktionen haben  $\Delta G$ -Werte, deren Absolutwerte, ohne Rücksicht auf das Vorzeichen, wesentlich größer sind als die positiven  $\Delta G$ -Werte der Bildungsreaktionen polymerer Moleküle aus ihren monomolekularen Untereinheiten. Der Trick, der allen diesen biosynthetischen Vorgängen, die an sich ein positives  $\Delta G$  haben, zugrunde liegt, beruht darauf, daß sie mit Abbaureaktionen gekoppelt sind, die negative  $\Delta G$ -Werte mit einem höheren Absolutwert haben. Das heißt, während der Proteinsynthese ist die Bildung jeder Peptidbindung ( $\Delta G = +0,5 \text{ kcal/Mol}$ ) mit der Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat, mit einem negativen  $\Delta G$ -Wert =  $-8 \text{ kcal/Mol}$ , verknüpft. Es resultiert also ein  $\Delta G$ -Wert von  $-7,5 \text{ kcal/Mol}$ , mehr als ausreichend um das Gleichgewicht zugunsten der Proteinsynthese anstatt des Abbaus zu verschieben.

## AKTIVIERUNG DURCH GRUPPENÜBERTRAGUNG

Wenn ATP zu ADP und P hydrolysiert wird, wird ein Großteil der freien Energie als Wärme freigesetzt. Da Wärmeenergie nicht zur Bildung kovalenter Bindungen herangezogen werden kann, kann die gekoppelte Reaktion nicht das Ergebnis zweier völlig getrennter, gleichzeitig ablaufender Reaktionen sein, eine mit positivem, die andere mit negativem  $\Delta G$ . Statt dessen wird eine gekoppelte Reaktion über zwei oder mehrere aufeinander folgende Reaktionsschritte erreicht. Diese Reaktionsschritte sind immer Gruppenübertragungsreaktionen: Reaktionen, die weder Oxydationen noch Reduktionen sind, sondern bei denen funktionelle Gruppen ausgetauscht werden. Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, nennt man Transferasen.





Da ATP daher der ursprüngliche biologische Akzeptor energiereicher Gruppen ist, muß es das Ausgangsprodukt für eine Vielzahl von Reaktionen sein, in deren Verlauf energiereiche Gruppen auf energiearme Moleküle übertragen werden, die so die Möglichkeit erhalten, spontane Reaktionen einzugehen. Die zentrale Bedeutung des ATP ist also darauf zurückzuführen, daß es zwei energiereiche Bindungen enthält, bei deren Spaltung spezifische Gruppen frei werden. Abbildung 5-2 zeigt drei wichtige Gruppen, die aus ATP entstehen: 1)  $\text{P} \sim \text{P}$ , eine Pyrophosphat-Gruppe; 2)  $\sim \text{AMP}$ , eine Adenosylmonophosphatgruppe und 3)  $\sim \text{P}$ , eine Phosphatgruppe. Es ist dabei wichtig, daß diese energiereichen Gruppen ihre Eigenschaft als solche nur dann behalten, wenn sie auf ein geeignetes Akzeptormolekül übertragen werden. Z.B. liefert die Übertragung einer  $\sim \text{P}$ -Gruppe auf eine  $\text{COO}^-$ -Gruppe zwar eine energiereiche  $\text{COO}^- \sim \text{P}$  Acylphosphatgruppe; die Übertragung derselben Gruppe auf die Hydroxylgruppe eines Zuckers ( $-\text{C}-\text{OH}$ ), wie bei der Bildung von Glucose-6- $\text{P}$ , gibt aber eine energiearme Bindung (Abnahme von  $\Delta G < 5 \text{ kcal/Mol}$  bei der Hydrolyse).

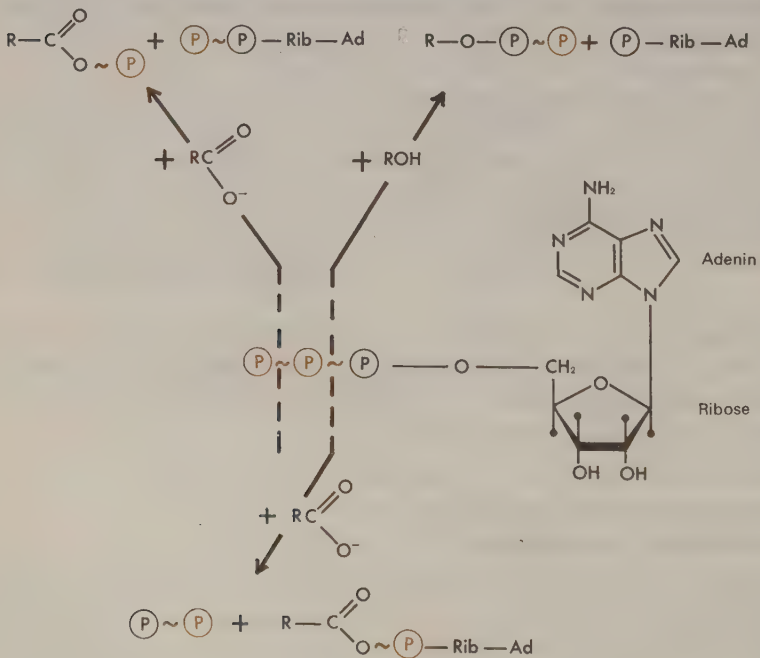
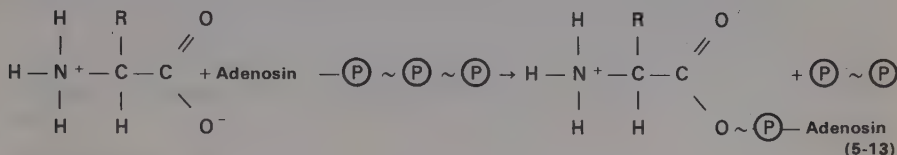


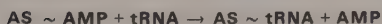
ABBILDUNG 5-2 Wichtige Gruppenübertragungsreaktionen, an welchen ATP beteiligt ist.

## AKTIVIERUNG VON AMINOSÄUREN DURCH BINDUNG VON AMP

Die Aktivierung einer Aminosäure wird durch Übertragung einer AMP-Gruppe von ATP auf die  $\text{COO}^-$ -Gruppe der Aminosäure erreicht.

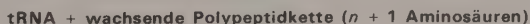


(R ist die jeweilige Seitenkette der Aminosäure). Die spezifischen Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, werden Aminosäuresynthetasen genannt. Nach der Aktivierung ist die Aminosäure thermodynamisch in der Lage, wirkungsvoll für die Proteinsynthese eingesetzt zu werden. Trotzdem sind die  $\text{AS} \sim \text{AMP}$ -Verbindungen nicht die unmittelbaren Vorstufen der Proteine. Aus Gründen, die wir in Kapitel 11 näher erläutern werden, muß statt dessen eine zweite Gruppenübertragung der Aminosäuren stattfinden, um die Aminosäuren zu übertragen; dadurch wird die am Carboxylende aktivierte Aminosäure auf das Ende eines tRNA-Moleküls übertragen:



(5-14)

Durch Kondensation des  $\text{AS} \sim \text{tRNA}$ -Moleküls mit dem Ende einer wachsenden Polypeptidkette wird dann die Peptidbindung gebildet.



(5-15)

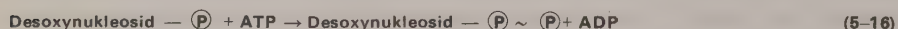
Im letzten Schritt dieser «gekoppelten Reaktion» muß also, wie bei allen gekoppelten Reaktionen, die aktivierende Gruppe abgespalten und die energie-reiche Bindung in eine mit einer geringeren freien Energie der Hydrolyse umgewandelt werden. So kommt das negative  $\Delta G$  zustande, welches die Reaktion in Richtung der Proteinsynthese treibt.

NUKLEINSÄUREVORSTUFEN WERDEN DURCH  $\text{P} \sim \text{P}$ -GRUPPEN AKTIVIERT

Beide Arten von Nukleinsäuren, DNA und RNA, sind aus Mononukleotiden (Nukleosid  $\text{P}$ ) aufgebaut. Mononukleotide sind jedoch thermodynamisch noch weniger als Aminosäuren dazu befähigt, Kondensationsprodukte zu

geben. Das ist darauf zurückzuführen, daß die Phosphodiesterbindungen, durch die sie verbunden sind, bei der Hydrolyse beträchtliche Mengen freier Energie abgeben ( $-6$  kcal/Mol). Das bedeutet, daß Nukleinsäuren langsam, aber spontan zu Mononukleotiden hydrolysieren. Es ist daher hier noch wichtiger als bei Proteinen, daß für die Synthese aktivierte Vorstufen herangezogen werden können.

Es wurde nachgewiesen, daß die unmittelbaren Vorstufen der DNA und RNA die Nukleosid-5'-triphosphate sind. Für DNA sind das dATP, dGTP, dCTP und dTTP (d steht für Desoxy); die Vorstufen für RNA sind ATP, GTP, CTP und UTP. ATP dient also nicht nur als Quelle energiereicher Gruppen bei Gruppenübertragungsreaktionen, sondern ist zusätzlich eine direkte Vorstufe der RNA. Die anderen drei RNA-Vorstufen werden alle durch Gruppenübertragungsreaktionen nach Gleichung (5-10) und (5-11) gebildet. Die Desoxytriphosphate werden grundsätzlich auf die gleiche Weise hergestellt. Nachdem die Desoxymononukleotide synthetisiert sind, werden sie durch Gruppenübertragung von ATP in die Triphosphate umgewandelt.



Diese Triphosphate können dann miteinander zu Polynukleotiden reagieren, die über Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Während dieses Vorgangs (einer Gruppenübertragungsreaktion) wird eine Pyrophosphatbindung gespalten und eine Pyrophosphatgruppe freigesetzt.



Diese Reaktion hat, im Gegensatz zur Bildung der Peptidbindungen, kein negatives  $\Delta G$ . Tatsächlich ist  $\Delta G$  sogar leicht positiv ( $\sim 0,5$  kcal/Mol). Da sich Polynukleotide ganz offensichtlich bilden können, muß man daher natürlich nach der Quelle der notwendigen freien Energie fragen.

## BEDEUTUNG DER $\textcircled{\text{P}} \sim \textcircled{\text{P}}$ FREISETZUNG FÜR DIE NUKLEINSÄURESYNTHESE

Die notwendige freie Energie stammt aus der Spaltung der energiereichen Pyrophosphatgruppe, die gleichzeitig mit der energiereichen Phosphodiesterbindung gebildet wird. Alle Zellen enthalten ein hochaktives Enzym, Pyrophosphatase, welches Pyrophosphatgruppen fast sofort nachdem sie gebildet werden, spaltet.





(5-19)

Das stark negative  $\Delta G$  bedeutet, daß die Reaktion praktisch irreversibel ist. Das bedeutet, daß eine  $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ -Bindung, die einmal gespalten ist, sich praktisch nie mehr zurückbildet.

Die Vereinigung der Nukleosidmonophosphatgruppen (Gleichung 5-16), gekoppelt mit der Spaltung der Pyrophosphatgruppen (Gleichung 5-19), hat eine Gleichgewichtskonstante, die durch die Summe der  $\Delta G$ -Werte der beiden Reaktionen gegeben ist:  $(0,5 \text{ kcal/Mol}) + (-7 \text{ kcal/Mol})$ . Der Gesamtwert ( $\Delta G = -6,5 \text{ kcal/Mol}$ ) zeigt, daß Nukleinsäuren praktisch nie unter Rückbildung ihrer Nukleosidtriphosphat-Vorstufen zerfallen.

Wir sehen hier ein besonders deutliches Beispiel dafür, daß häufig die Summe der  $\Delta G$ -Werte einer zusammengehörigen Reihe bestimmt, ob eine der Reaktionen dieser Reihe stattfindet oder nicht. Reaktionen mit kleinen, positiven  $\Delta G$ -Werten, die alleine nie ablaufen würden, sind oft Teil eines wichtigen Stoffwechselweges, in dem sie von Reaktionen mit stark negative  $\Delta G$  begleitet sind. Wir müssen uns jederzeit vor Augen halten, daß eine einzelne Reaktion (oder auch ein einzelner Reaktionszyklus) nie isoliert auftritt, sondern daß die Art des Gleichgewichts ständig durch die Zugabe oder Entnahme anderer Stoffwechselprodukte beeinflusst wird.

#### SPALTUNGEN VON $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ -BINDUNGEN SIND FÜR DIE MEISTEN BIOSYNTHETISCHEN REAKTIONEN CHARAKTERISTISCH

Die Nukleinsäuresynthese ist nicht die einzige Reaktion, deren Richtung durch Freisetzung und anschließender Spaltung der  $\textcircled{P} \sim \textcircled{P}$ -Bindung bestimmt ist. Es scheint ganz allgemein so zu sein, daß praktisch alle biosynthetischen Reaktionen einen oder mehrere Schritte enthalten, in deren Verlauf Pyrophosphatgruppen frei werden. Man betrachte z.B. die Aktivierung der Aminosäuren durch AMP. An sich hat die Übertragung einer energiereichen Bindung von ATP auf den AS-AMP-Komplex ein schwach positives  $\Delta G$ . Auch hier liefert die Freisetzung und Spaltung der endständigen Pyrophosphatgruppe des ATPs das negative  $\Delta G$ , das für den Ablauf der Reaktion notwendig ist.

Die Bedeutung der Spaltung von Pyrophosphatgruppen zeigt sich deutlich, wenn man die Schwierigkeiten in Betracht zieht, die auftreten würden, falls eine Zelle die Nukleinsäuren aus Nukleosiddiphosphaten statt Triphosphaten synthetisieren wollte. Statt der Pyrophosphatgruppen würden bei der Bildung der Phosphodiesterbindung des Skeletts Phosphatgruppen frei werden. Phosphodiesterbindungen sind jedoch in Gegenwart größerer Phosphatkonzentra-

nitionen nicht stabil, da sie ohne nennenswerte Abgabe freier Energie gebildet werden. Die Biosynthese wäre also sehr leicht reversibel; sobald sich Phosphat anhäuft, würde die Reaktion in umgekehrter Richtung, also Spaltung von Nukleinsäuren, ablaufen (Massenwirkungsgesetz). Die Zelle kann auch die Phosphatgruppen nicht sofort nach ihrer Bildung entfernen (und so die umgekehrte Reaktion verhindern), da alle Zellen einen ziemlich hohen Phosphatspiegel für ihr Wachstum brauchen. Die Verwendung von Nukleosidtriphosphaten als Vorstufen von Nukleinsäuren ist daher kein Zufall.

Ähnliche Überlegungen zeigen auch, warum in allen Zellen ATP, und nicht ADP, der Hauptlieferant energiereicher Bindungen ist. Ursprünglich schien die Wahl rein zufällig. Jetzt wissen wir aber, daß viele Reaktionen, die ADP als Energiequelle benützen, gleich gut in beiden Richtungen ablaufen können.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Die Biosynthese vieler Moleküle scheint bei oberflächlicher Betrachtung gegen das Gesetz der Thermodynamik zu verstoßen, daß spontan ablaufende Reaktionen immer vom Abnehmen freier Energie (negatives  $\Delta G$ ) begleitet sein müssen. So hat z.B. die Bildung von Proteinen aus Aminosäuren ein positives  $\Delta G$ . Dieser Widerspruch verschwindet, wenn man erkennt, daß biosynthetische Reaktionen anders ablaufen als ursprünglich postuliert. Proteine werden z.B. nicht aus freien Aminosäuren gebildet. Statt dessen werden die Vorstufen zuerst enzymatisch in energiereiche, aktivierte Verbindungen umgewandelt, die sich dann in Gegenwart eines spezifischen Enzyms spontan zum gewünschten Biosynthese-Produkt vereinigen.*

*Viele biosynthetische Vorgänge sind folglich das Ergebnis «gekoppelter» Reaktionen, wobei der erste Schritt die Energie liefert, die für den spontanen Ablauf des zweiten notwendig ist. Die wichtigste Energiequelle einer Zelle ist ATP. Es entsteht bei Abbauprozessen (Gärung oder Atmung) oder bei der Photosynthese aus ADP und anorganischen Phosphaten. ATP enthält mehrere (energiereiche) Bindungen, deren Hydrolyse stark negative  $\Delta G$ -Werte hat. Gruppen, die über energiereiche Bindungen verknüpft sind, werden energiereiche Gruppen genannt. Energiereiche Gruppen können durch Gruppenübertragungsreaktionen an andere Moleküle abgegeben werden, wodurch neue energiereiche Verbindungen entstehen. Diese energiereichen Derivate werden dann als unmittelbare Vorstufen für viele Biosynthesevorgänge verwendet.*

*Aminosäuren werden durch AMP-Gruppen, die von ATP geliefert werden, zu AS  $\sim$  AMP-Molekülen aktiviert. Die Bindungsenergie der energiereichen Bindung des AS  $\sim$  AMP-Moleküls ist der energiereichen ATP-Bindung ähnlich. Trotzdem verläuft die Gruppenübertragungsreaktion quantitativ, da das*

energiereiche  $\text{P} \sim \text{P}$ -Molekül, das bei der  $\text{AS} \sim \text{AMP}$ -Bildung frei wird, durch das Enzym Pyrophosphatase in energiearme Gruppen gespalten wird. Die umgekehrte Reaktion  $\text{P} \sim \text{P} + \text{AS} \sim \text{AMP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AS}$  kann daher nicht stattfinden.

Man kann die allgemeine Regel aufstellen, daß  $\text{P} \sim \text{P}$  bei fast allen biosynthetischen Reaktionen frei wird. Fast sofort nach seiner Bildung wird es enzymatisch zu 2  $\text{P}$  abgebaut, wodurch eine Umkehr der Biosynthesereaktion unmöglich wird. Die große Nutzbarkeit der Spaltung von  $\text{P} \sim \text{P}$  erklärt, warum ATP und nicht ADP, die hauptsächliche Energiequelle einer Zelle ist. ADP kann nicht gleichzeitig energiereiche Gruppen übertragen und  $\text{P} \sim \text{P}$  als Nebenprodukt liefern.

## LITERATUR

- Karlsen, P., *Introduction to Modern Biochemistry*, 3. Aufl., Academic, New York, 1960. Einleitung mittleren Umfanges in die Biochemie, mit Betonung des Intermediärstoffwechsels.
- Mahler, H. R., und E. H. Cordes, *Biological Chemistry*, Harper and Row, New York, 1966. Das vollständigste neue Lehrbuch, das die gesamte Biochemie abhandelt.
- White, A., P. Handler und E. L. Smith, *Principles of Biochemistry*, 3. Aufl., McGraw-Hill, New York, 1964. Eine bewundernswerte Übersicht über die Biochemie der Zelle, ausgezeichnet in der Behandlung des Intermediärstoffwechsels.
- Krebs, H. A., und H. L. Kornberg, «A Survey of the Energy Transformation in Living Material», *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmacol.*, **49**, 212 (1957). Dieser ausführliche Übersichtsartikel ist einer der wenigen Klassiker der Biochemie. Obwohl viele Details aufgrund späterer Forschungen revidiert wurden, kann er noch immer mit großem Profit gelesen werden.
- Kornberg, A., «On the Metabolic Significance of Phosphorolytic and Pyrophosphorolytic Reactions», in M. Kasha und B. Pullman (Eds.), *Horizons in Biochemistry*, S. 251-264, Academic, New York, 1962. In diesem kurzen Artikel findet man einige detaillierte Argumente über die Bedeutung der Pyrophosphatfreisetzung.

# 6

## DER BEGRIFF

## DER MATRIZEN-

## OBERFLÄCHE

Der Chemiker weiß inzwischen, daß es verschiedene «Grundgeheimnisse des Lebens» gibt, von denen die Fähigkeit einer Zelle, zu wachsen und sich zu teilen abhängt. Erstens muß eine hoch organisierte Oberflächenmembran vorhanden sein, die aufgrund selektiver Permeabilität eine hohe Konzentration zelleigener Verbindungen aufrecht erhalten kann. Zweitens muß es Enzyme geben, die die Umwandlung von Nährstoffmolekülen in neue Zellbausteine katalysieren. Drittens muß Energie aus der Nahrung oder von der Sonne in eine Form gebracht werden, die garantiert, daß das thermodynamische Gleichgewicht auf Seiten der Biosynthese, und nicht des Abbaues liegt.

Alle diese Eigenschaften hängen eng mit der Existenz von Proteinen zusammen. Nur diese Makromoleküle mit ihren 20 verschiedenen Bausteinen besitzen genügend Spezifität, um selektiv permeable Membranen aufzubauen oder hoch spezifische chemische Umwandlungen zu katalysieren. Wir müssen also zu der Liste der «Grundgeheimnisse des Lebens» noch die Fähigkeit hinzufügen, physiologisch richtige Mengen spezifischer Proteine zu synthetisieren. Diese Forderung scheint auf den ersten Blick unter die allgemeinere Bedingung einer Enzymkatalysierten Biosynthese zu fallen. Aber wir werden bald sehen, daß die Synthese von Proteinen nicht nach den gleichen Regeln wie die Synthese kleinerer Moleküle abläuft. Dieser Punkt wird klar, wenn wir betrachten, wie Enzyme dazu dienen, immer größer werdende Moleküle zu bilden.



## SYNTHESE KLEINER MOLEKÜLE

Wir wollen zuerst die Synthese der Aminosäure Serin in *E. coli* betrachten, wenn Glucose als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Abbildung 6-1 zeigt die dreistufige Synthese von Serin aus 3-Phospho-

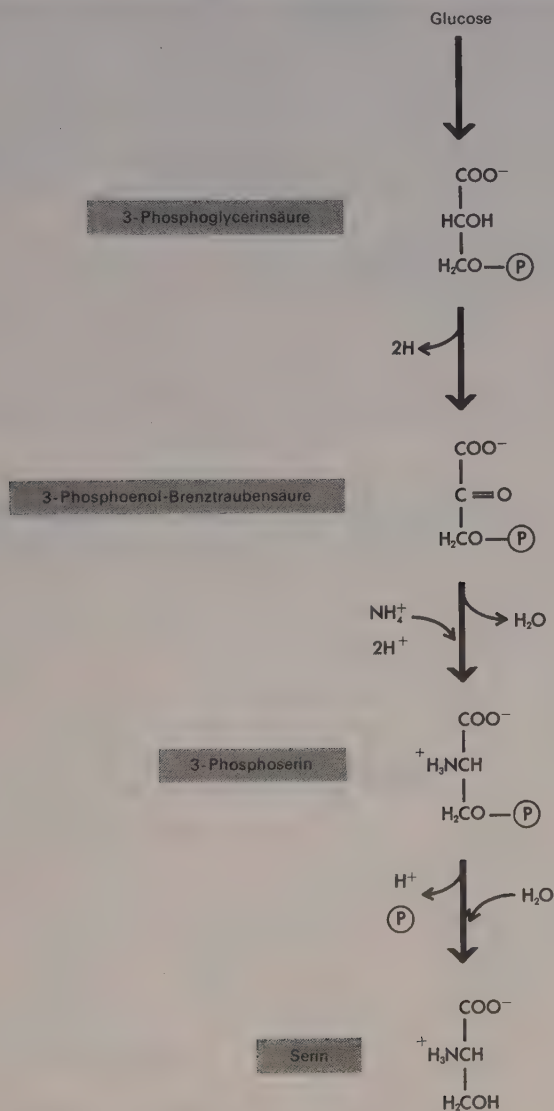


ABBILDUNG 6-1 Serin-Biosynthese.

glycerinsäure, eines Schlüsselprodukts des normalen Glucose-Abbaus (Abbildung 2-6). Serin kann in mehreren Schritten, deren Chemie noch nicht genau bekannt ist, zur einfachsten Aminosäure, Glycin, abgebaut werden. Jeder dieser Schritte erfordert ein spezifisches Enzym mit einer ganz bestimmten Oberfläche, an die nur das zugehörige Substrat gebunden werden kann. Jede der 18 anderen Aminosäuren wird nach den gleichen Prinzipien synthetisiert. In jedem Fall dient ein Stoffwechselprodukt der Glucose als Ausgangsmaterial für eine Reihe spezifischer Enzym-katalysierter Reaktionen, über die man schließlich die betreffende Aminosäure erhält. Auch die Purin- und Pyrimidinnukleotide, die Bausteine der DNA und RNA, werden über eine Reihe aufeinanderfolgender Reaktionen synthetisiert, welche mit kleineren Molekülen beginnen, deren Kohlenstoffatome aus der Glucose stammen.

Einige der Reaktionen, die zur Synthese des Pyrimidinnukleotids Uridin-5'-phosphat führen, sind in Abbildung 6-2 gezeigt. Die Synthese der etwas größeren Purinnukleotide erfordert mehr Reaktionsschritte, da mehr kovalente Bindungen geknüpft werden müssen. Auch hier herrschen die gleichen Regeln: 1) für jede Reaktion ist ein anderes spezifisches Enzym notwendig und 2) die Summe aller Reaktionen führt zur Freisetzung freier Energie.

Die Freisetzung der Energie (gewöhnlich als Wärme) bedeutet, daß das thermodynamische Gleichgewicht die Bildung biosynthetischer Reaktionsprodukte begünstigt, die für das Zellwachstum notwendig sind. Häufig wird das dadurch erreicht, daß eines der Substrate mit dem energiereichen ATP reagiert, wobei ein aktives Substrat entsteht, in welchem die Phosphat ( $\sim \text{P}$ ), Pyrophosphat ( $\sim \text{P} \sim \text{P}$ ) oder Adenylsäure-Gruppe ( $\sim \text{AMP}$ ) an ein Atom gebunden ist, das an der Bildung der gewünschten biosynthetischen Bindung beteiligt ist. Eine typische ATP-abhängige Synthese ist die Umwandlung von Ribose-5- $\text{P}$  in 5-Phosphoribosylamin (PRA) (Abbildung 6-3). Diese Umwandlung ist einer der ersten Schritte der Purinnukleotidsynthese und verläuft in zwei enzymatischen Schritten. Im ersten Reaktionsschritt reagiert Ribose-5- $\text{P}$  mit ATP zu ADP und 5-Phosphoribosyl-pyrophosphat (PRPP). Anschließend reagiert PRPP mit Glutamin unter Bildung von PRA,  $\text{P} \sim \text{P}$  und Glutaminsäure. Das Gleichgewicht der ersten Reaktion begünstigt die Synthese von PRPP, da die ATP-Pyrophosphatbindung energiereicher ist als die Phosphatesterbindung ( $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ ), die  $\text{P} \sim \text{P}$  an Ribose-5- $\text{P}$  bindet. Entsprechend liegt das zweite Gleichgewicht auf Seiten der PRA-Bildung, da das entstehende  $\text{P} \sim \text{P}$ -Produkt durch Pyrophosphatase zu  $2\text{P}$  abgebaut wird.

In beiden Syntheseschritten wird also Energie als Wärme abgegeben. Im Gegensatz dazu besteht zwischen der ursprünglichen  $\text{C}-\text{O}$ -Bindung von Ribose-5- $\text{P}$  und der gebildeten  $\text{C}-\text{N}$ -Bindung nur ein kleiner Energieunterschied. Die Aktivierung durch einen Energielieferanten ist daher

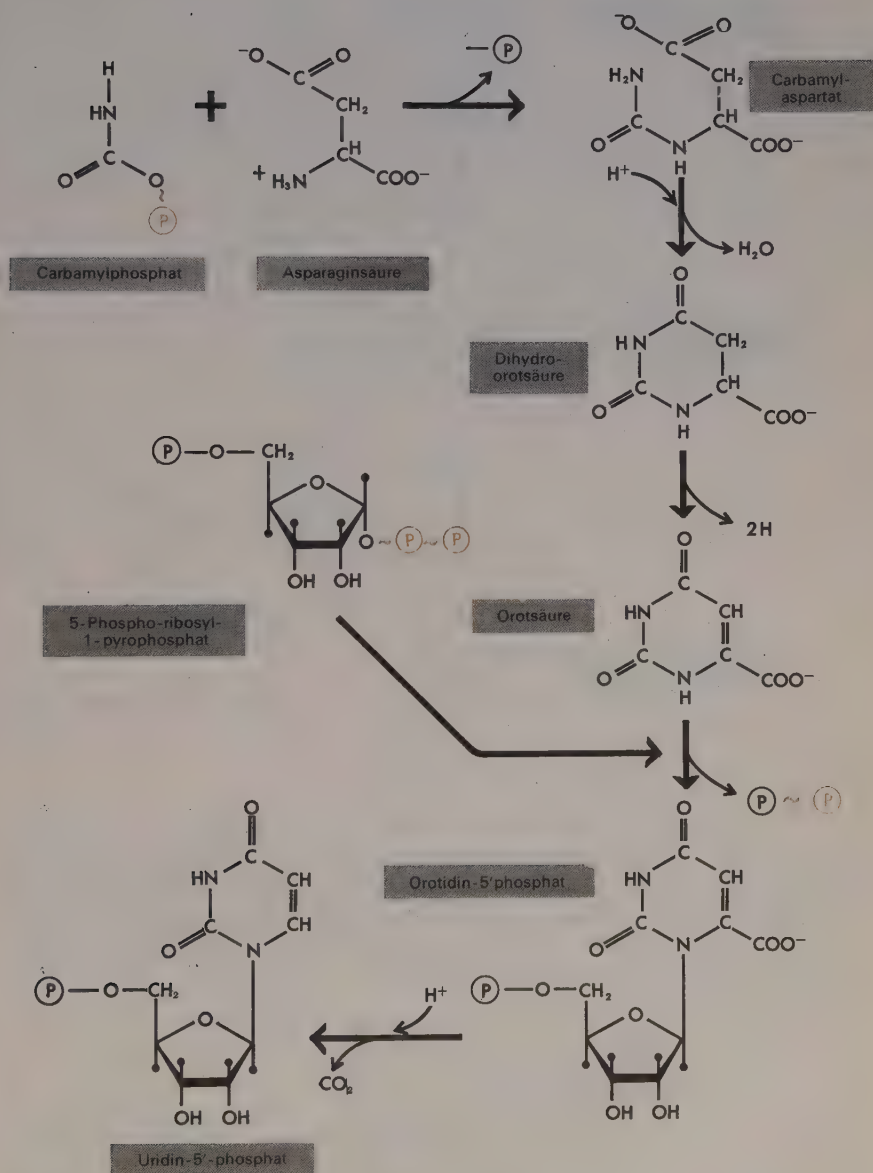


ABBILDUNG 6-2 Die Biosynthese von Uridin-5'-phosphat.

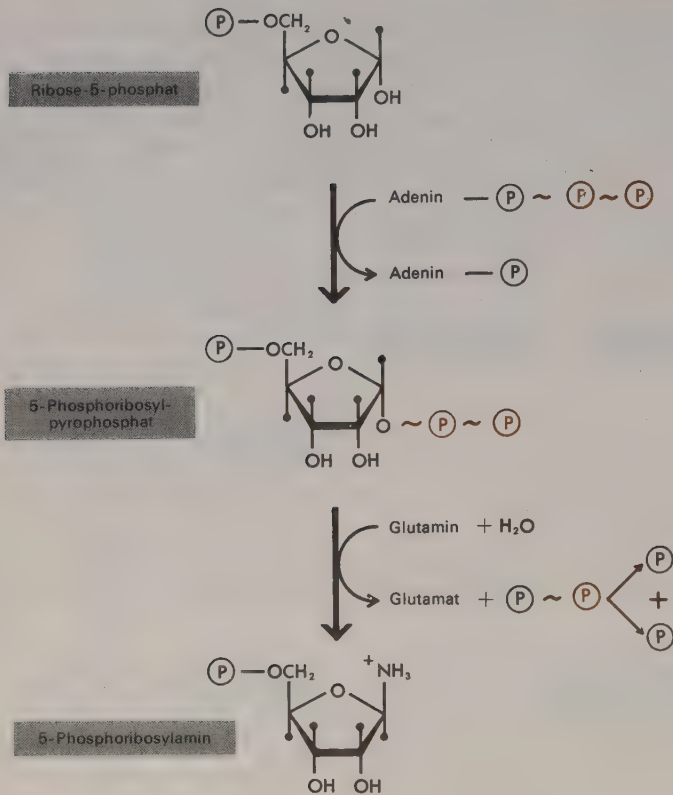


ABBILDUNG 6-3 Erste Schritte der Purin-Biosynthese.

eine notwendige Voraussetzung für diesen Biosyntheseschritt. Aktivierung ist jedoch nicht für jede Biosynthese notwendig. In manchen Fällen haben die in Frage kommenden kovalenten Bindungen eines notwendigen Zellbausteins einen merklich geringeren Energieinhalt als die Bindungen der Stoffwechselprodukte, aus denen sie entstehen.

## SYNTHESE GROSSER «KLEINER MOLEKÜLE»

Die Synthese des Chlorophylls (Abbildung 6-4) ist ein geeignetes Beispiel für diesen Fall. Die Totalsynthese dieser Verbindung (MG = 892) gelang erst kürzlich und erscheint auch einem routinierten organischen Chemiker noch sehr komplex. Die Verbindung enthält den komplizierten Porphyrinring,



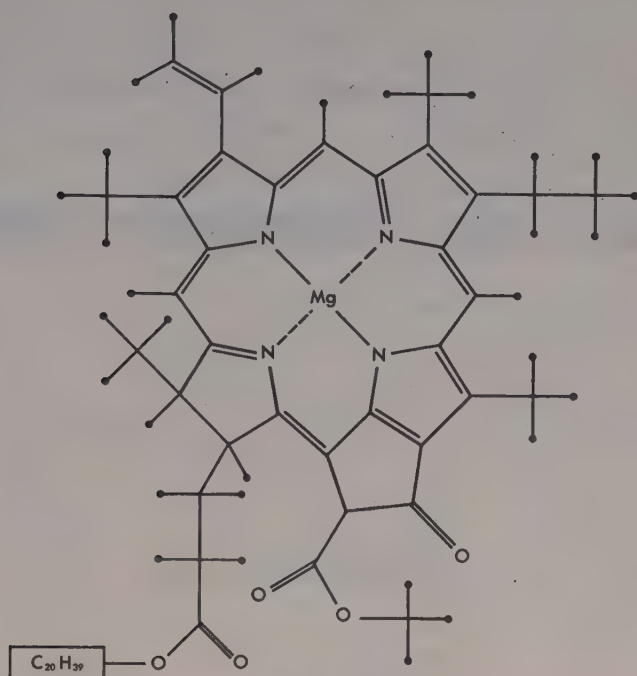


ABBILDUNG 6-4 Die Struktur des Chlorophylls.

an den ein langkettiger unverzweigter Alkohol (Phytol) gebunden ist. Bis jetzt ist die Biosynthese nur in groben Zügen bekannt. Die Porphyrin- und Phytolkomponenten werden wahrscheinlich getrennt synthetisiert und erst später zusammengefügt. Das meiste, was man bisher über die Synthese weiß, betrifft den Aufbau des Porphyrinringes (Abbildung 6-5). Eine große Zahl von Enzymen ist an der Umordnung der C, N, O und H-Atome beteiligt, die ursprünglich in den viel kleineren Vorstufen Glycin und Succinyl ~ Coa enthalten sind. Es gibt also keine qualitativen neuen Merkmale, die die Synthese so komplizierter Verbindungen, wie der des Chlorophylls, von der einfacheren organischer Moleküle unterscheiden. In beiden Fällen sind spezifische Enzyme und ein günstiges thermodynamisches Gleichgewicht notwendig. Es besteht nur ein quantitativer Unterschied, und zwar erfordert die Synthese großer komplexer Moleküle eine größere Anzahl verschiedener Enzyme und im allgemeinen auch einen größeren Energieaufwand.

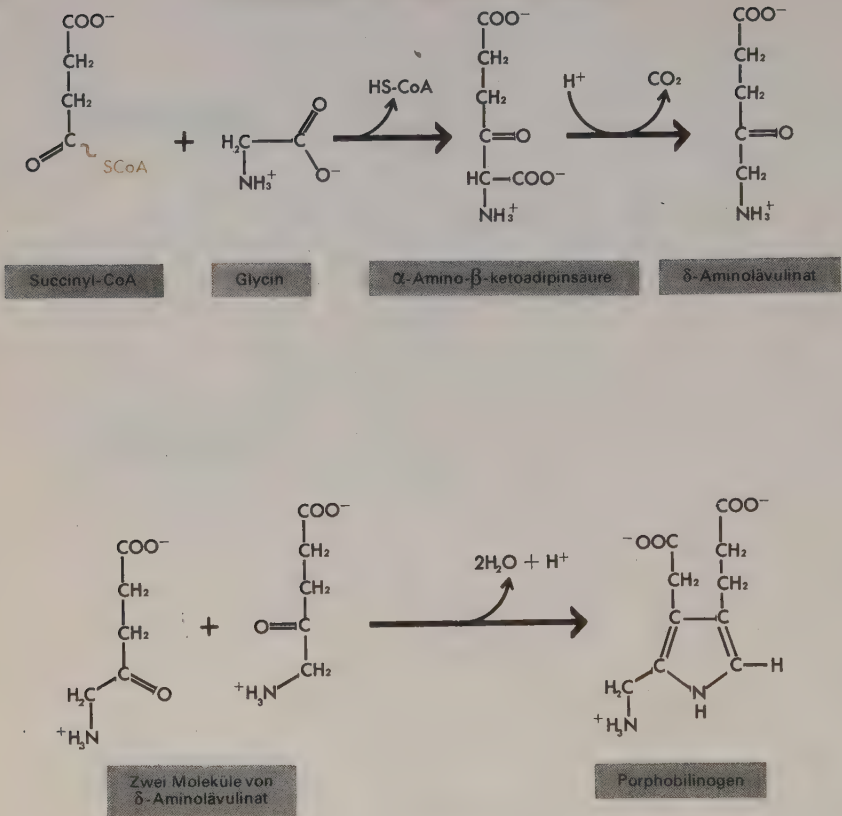


ABBILDUNG 6-5 Die Biosynthese des Porphyrins.

## SYNTHESE EINES REGELMÄSSIGEN, SEHR GROSSEN POLYMEREN MOLEKÜLS

Glykogen ist ein Makromolekül mit einem MG von oft mehr als einer Million. Trotzdem sind nur 4 verschiedene Enzyme notwendig, um Glykogen aus Glucose aufzubauen, da Glykogen ein Polymeres ist, das durch wiederholte Verknüpfung von Glucose zustandekommt. Abbildung 6-6 zeigt die spezifischen Reaktionsschritte, durch die Glucose am Kohlenstoffatom 1 aktiviert und anschließend polymerisiert wird. Nur ein einziges Enzym ist für den endgültigen Polymerisationsschritt notwendig, da in jedem Schritt dieser Polymerisation die gleiche chemische Bindung geknüpft wird. Fast alle Bindungen sind glykosidische Bindungen (C—O—C) zwischen den Koh-

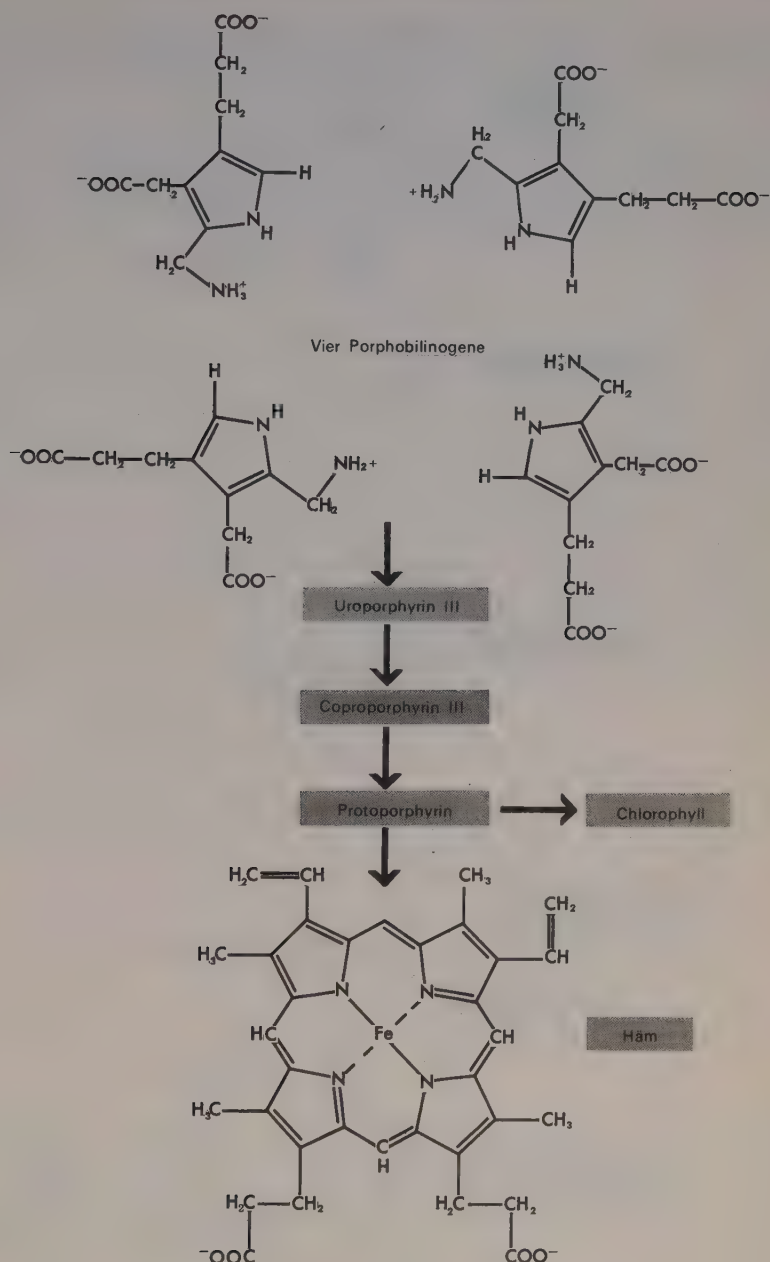


ABBILDUNG 6-5 (Fortgesetzt).

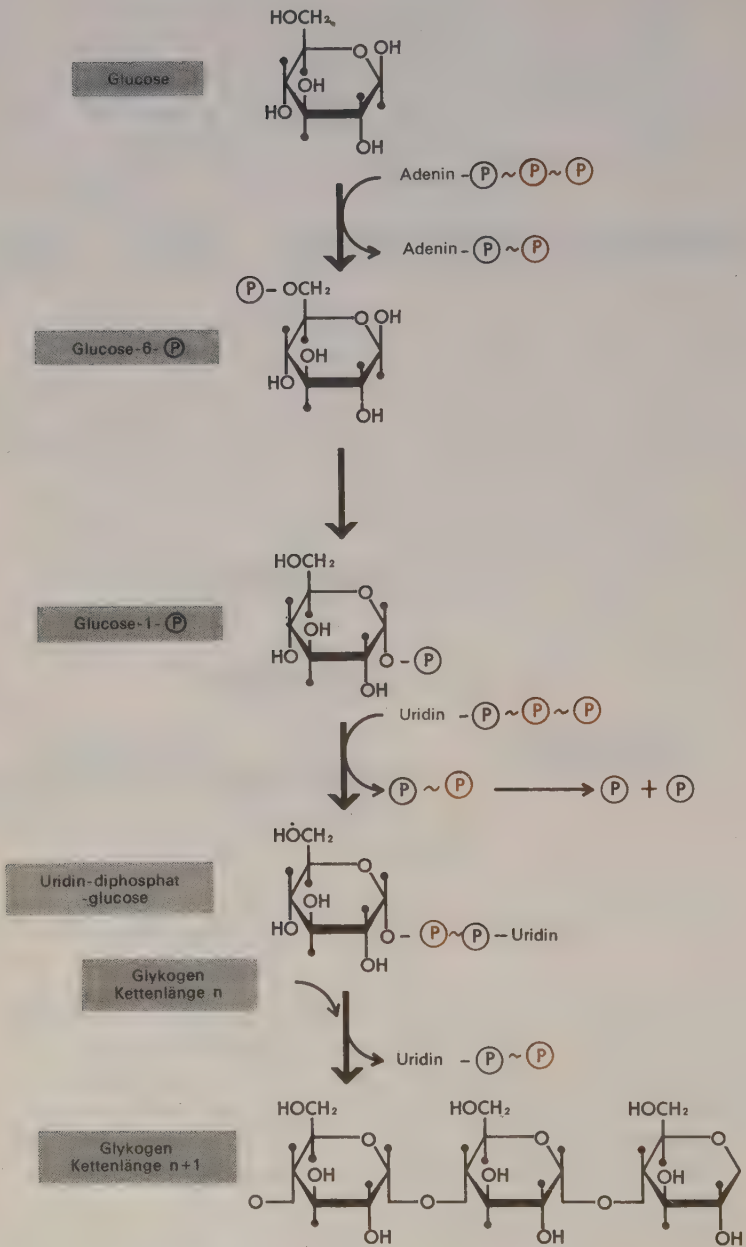


ABBILDUNG 6-6 Glykogen-Biosynthese aus Glucose.



lenstoffatomen 1 und 4. Viel seltener wird eine 1-6 glykosidische Bindung von einem anderen Enzym katalysiert. Als Folge davon ist Glykogen häufig verzweigt.

Wir sehen daraus, daß die Zahl der Enzyme, die am Aufbau eines Moleküls beteiligt sind, im wesentlichen von seiner chemischen Komplexität und nicht so sehr von seiner Größe abhängig ist. Glykogen, das für den organischen Chemiker relativ leicht verständlich ist, stellt also auch den Biochemiker vor keine grundlegenden Probleme.

## EINE GENAUERE BETRACHTUNG DER PROTEINSTRUKTUR

Bevor wir uns mit den Problemen der Proteinsynthese auseinandersetzen, müssen wir uns etwas genauer mit der Proteinstruktur beschäftigen. Proteine sind ungeheuer komplexe Makromoleküle, da sie aus 20 verschiedenen Unter-einheiten, den Aminosäuren, zusammengesetzt sind. Ein Chemiker muß daher sowohl die Art der Verknüpfung der Aminosäuren als auch die Reihenfolge innerhalb einer bestimmten linearen Polypeptidkette bestimmen. Der Biochemiker möchte entsprechend wissen, wie die Bindungen des Skeletts entstehen und auch welche Tricks angewendet werden, um die Aminosäure während der Synthese in der richtigen Reihenfolge zu ordnen. In beiden Fällen erweisen sich die Fragen nach der Sequenz als die schwierigeren.

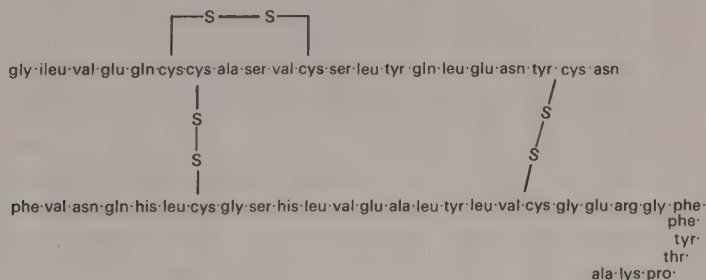


ABBILDUNG 6-7 Die Aminosäuresequenz des Rinderinsulins.

Tatsächlich wurde die erste vollständige Aminosäuresequenz erst 1953 bekannt. Das untersuchte Protein war das Hormon Insulin, ein relativ kleines Protein, das 51 Aminosäuren enthält (Abbildung 6-7). In letzter Zeit wurden die Aminosäuresequenzen vieler zusätzlicher Proteine aufgeklärt. Eines der größten dieser Proteine ist mit 246 Aminosäuren das Enzym Chymotrypsinogen, das die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert. Für die Aufklärung seiner Sequenz (Abbildung 6-8) hätte ein einzelner Chemiker fast

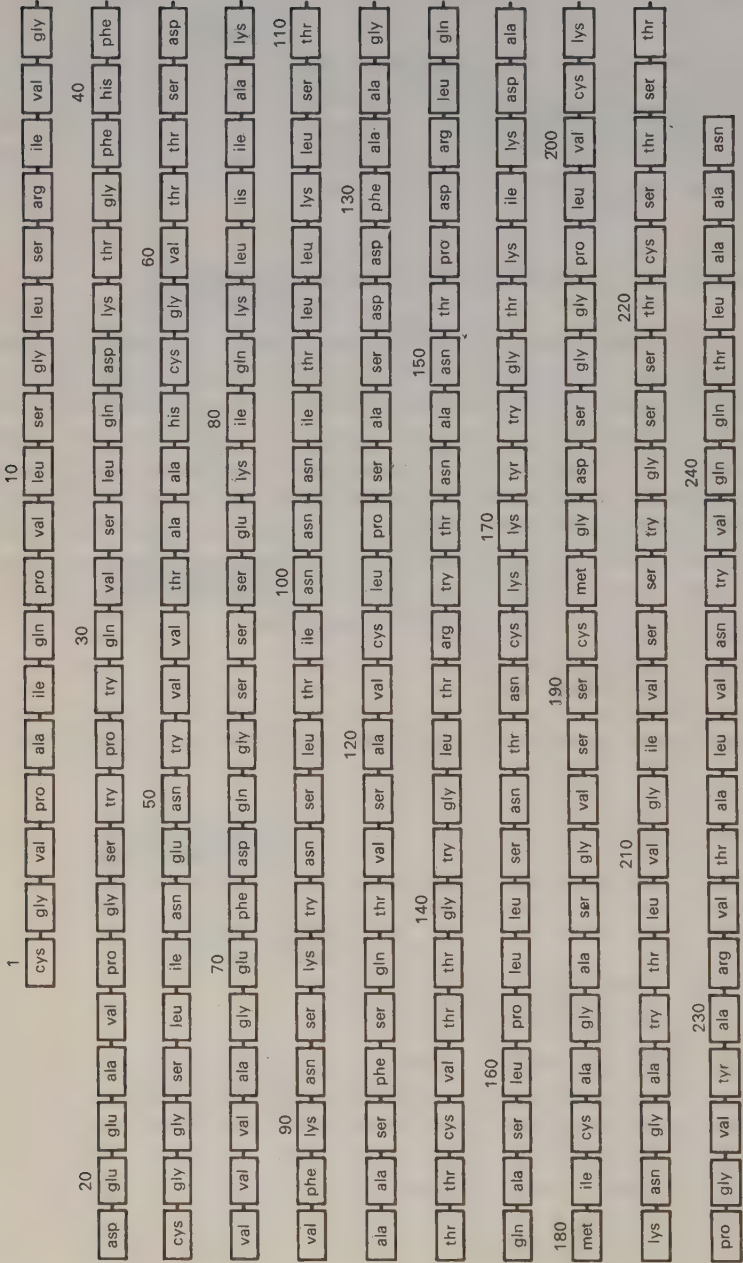


ABBILDUNG 6-8 Die Aminosäuresequenz des Proteins Chymotrypsinogen.

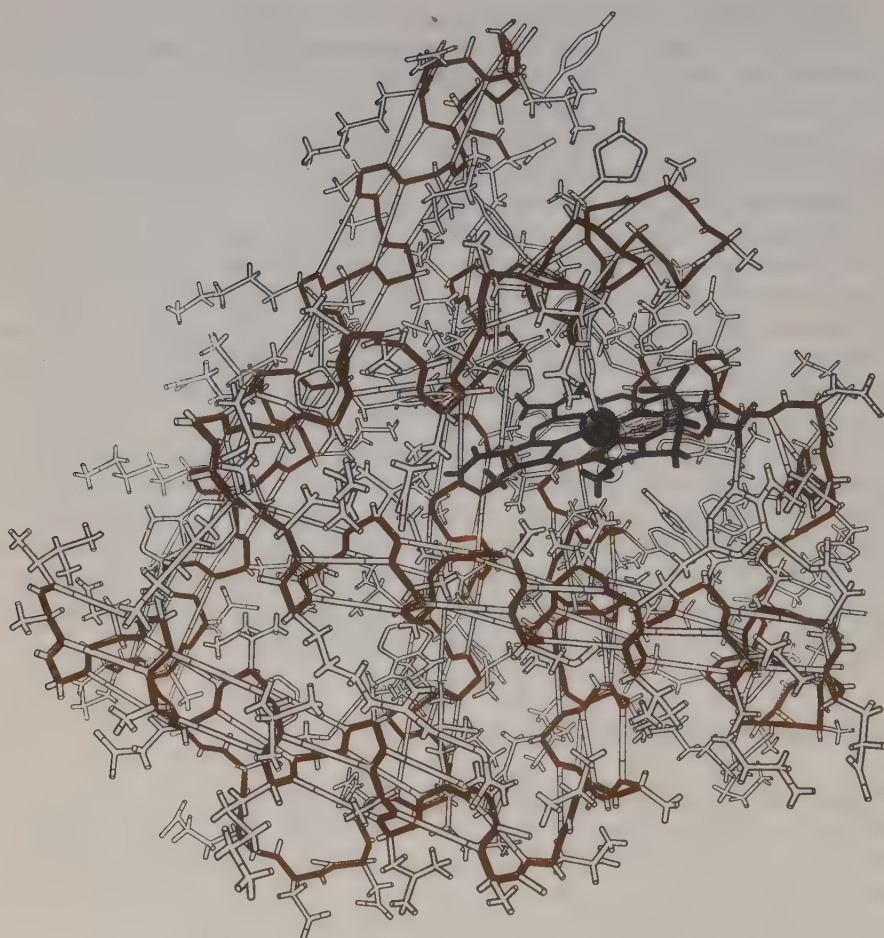
15 Jahre gebraucht; tatsächlich waren mehrere erstklassige Wissenschaftler daran beteiligt. Heute erleichtern neue experimentelle Methoden die Sequenzanalysen. Mit etwas Glück kann man innerhalb eines Jahres die Struktur eines relativ kleinen Proteins aufklären.

Neben der Frage nach der Sequenz gibt es noch das Problem, wie Polypeptidketten ihre endgültige 3-D-Konfiguration annehmen. Das richtige Funktionieren fast aller Proteine hängt nicht nur von der richtigen Aminosäuresequenz, sondern auch von ihrer räumlichen Anordnung ab. Wir haben aber schon in Kapitel 4 darauf hingewiesen, daß das Polypeptidskelett nicht völlig starr ist, sondern daß viele seiner Atome frei rotieren und verschiedene Positionen zueinander einnehmen können. Das Bestreben, die stabilsten schwachen Wechselwirkungen einzugehen, begünstigt jedoch für jedes Protein eine ganz bestimmte Konfiguration. Es gibt sehr gute indirekte Beweise dafür, daß, unter gegebenen Bedingungen, alle Proteine mit identischer Aminosäuresequenz die gleiche «native» 3-dimensionale Gestalt annehmen. Diese Ansicht wurde kürzlich durch die Bestimmung der 3-D-Struktur des sauerstofftragenden Proteins Myoglobin direkt unterstützt. Abbildung 6-9 zeigt die Struktur, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde. Obwohl das Molekül ungeheuer komplex ist, zeigt eine nähere Betrachtung wichtige, vereinfachende Strukturmerkmale: die Kette ist so gefaltet, daß atomare Gruppierungen, die einander anziehen, zusammenkommen.

## DIE PRIMÄRSTRUKTUR VON PROTEINEN

Myoglobin, das 153 Aminosäuren enthält, ist ein Beispiel für viele Proteine, die nur aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Viele andere Proteine sind aus zwei oder mehr Ketten aufgebaut. Z.B. gibt es im Hämoglobinmolekül (MG 64.500) vier Polypeptidketten. Die Zahl der Ketten und die Reihenfolge der Aminosäuren nennt man die «*Primärstruktur*» der Proteine. Enthält ein Molekül mehrere Ketten, werden diese häufig durch schwache Wechselwirkungen zusammengehalten. In anderen Fällen werden sie durch Disulfidbrücken (S-S) zwischen Cysteinseitenketten verbunden, wie z.B. die beiden Ketten des Insulins (Abbildung 6-7). Disulfidbrücken sind außerdem wichtig, um einzelnen Ketten eine starre Gestalt zu verleihen. In Chymotrypsinogen gibt es 5 Disulfidbrücken, die jeweils spezifische Cysteinreste verknüpfen (Abbildung 6-10).

Eine Reihe von Proteinen enthalten zusätzliche prosthetische Gruppen (keine Proteine), die eine entscheidende Bedeutung für ihre Funktion haben. Häufig handelt es sich dabei um metallorganische Verbindungen. Sowohl Myoglobin als auch Hämoglobin enthalten als prosthetische Gruppe die metallorganische Verbindung Häm, die mit der Porphyrinkomponente des

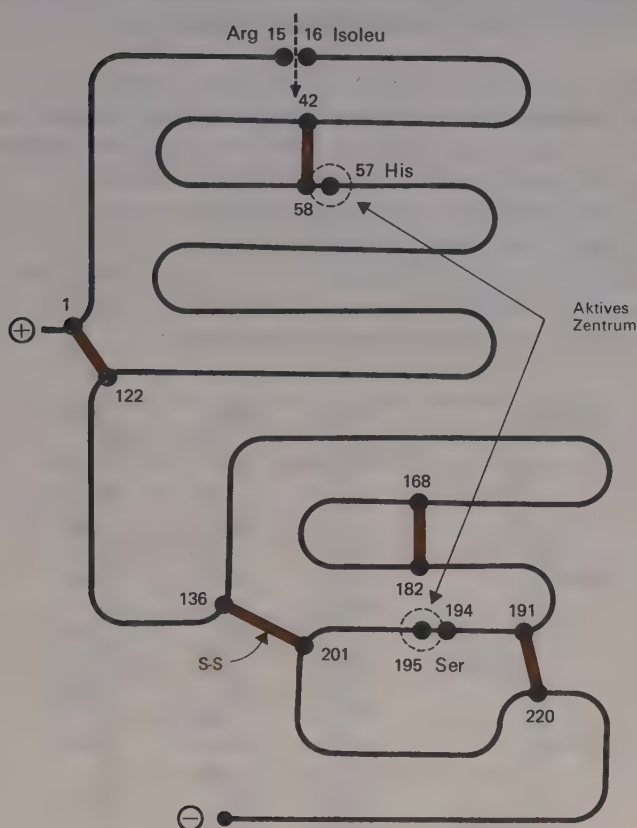


**ABBILDUNG 6-9** Die 3-D-Struktur von Myoglobin, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse. Das Polypeptidskelett ist farbig abgebildet, die Häm-Gruppe grau. [Aus J. C. Kendrew, Sci. Am. 205, 100-101 (1961), mit Genehmigung].

Chlorophylls nahe verwandt ist. Häm reagiert mit  $O_2$  und verleiht so Hämoglobin und Myoglobin die Fähigkeit, Sauerstoff zu binden.

Eine charakteristische Eigenschaft prosthetischer Gruppen ist die, daß sie nur eine sehr geringe funktionelle Aktivität aufweisen, wenn sie nicht an ihr zugehöriges Polypeptid gebunden sind. Z.B. verbindet sich Häm irreversibel mit  $O_2$ . Nur in Verbindung mit Hämoglobin oder Myoglo-



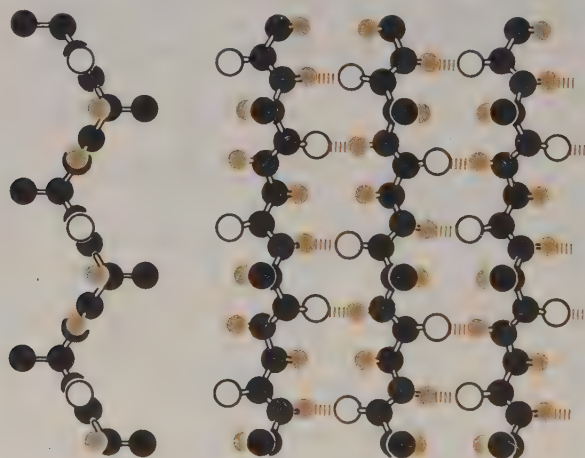


**ABBILDUNG 6-10** Die Anordnung der S-S-Bindungen im Chymotrypsinogen. Intakte Chymotrypsinogen-Moleküle sind enzymatisch inaktiv. Erst nach Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 15 und 16 werden sie aktiv. Das aktive Spaltprodukt heißt Chymotrypsin. Die 3-D-Struktur des Chymotrypsinogens ist jetzt mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden und sein Wirkungsmechanismus ist zum Teil bekannt. Beweise liegen vor, daß der Serinrest in Position 195 und der Histidinrest in Position 57 am aktiven Zentrum beteiligt sind. Die Kette ist so gefaltet, daß diese beiden Aminosäuren einander nahe gebracht werden.

bin kann Häm Sauerstoff reversibel binden. Danach kann es den gebundenen Sauerstoff freisetzen, wenn das unter Bedingungen des Sauerstoffmangels notwendig ist.

## SEKUNDÄRSTRUKTUREN VON PROTEINEN KÖNNEN FALTBLATTSTRUKTUREN ODER HELICES SEIN

Der Ausdruck «*Sekundärstruktur von Proteinen*» bezieht sich auf die regelmäßige Anordnung des Polypeptidskeletts. Eine dieser regelmäßigen Anordnungsmöglichkeiten enthält Wasserstoffbrücken zwischen Gruppen auf verschiedenen Polypeptidketten. Bei diesen Konfigurationen – die man zusammenfassend  $\beta$ -Strukturen nennt – bilden völlig gestreckte Polypeptidketten faltblattähnliche Strukturen, die durch  $\text{N}-\text{H} \cdots \text{C}=\text{O}$  Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden (Abbildung 6-11).  $\beta$ -Strukturen werden durch die Anwesenheit vieler Glycin- und Alaninreste begünstigt. In der Natur kommen sie hauptsächlich in Seidenproteinen vor.



**ABBILDUNG 6-11** Beispiel für gestreckte Polypeptidketten, die durch Wasserstoff-Brückenbindungen in einer Faltblatt-ähnlichen Struktur zusammengehalten werden ( $\beta$ -Struktur). (Zeichnung nach L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond*, 3. Aufl., Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, S. 501, mit Genehmigung).

Die wichtigste regelmäßige Struktur von Polypeptidketten beruht jedoch auf Wasserstoffbrücken zwischen Gruppen auf derselben Kette. Diese Wasserstoffbrücken führen zu einer Verschraubung des Polypeptidskeletts zu einer Helix. Die wichtigste Polypeptidhelix ist die  $\alpha$ -Helix, die wir in Kapitel 4 (Abbildung 4-13) als Beispiel für Helixsymmetrie angeführt haben. Aus Röntgenstrukturanalysen weiß man, daß lange Abschnitte des Polypeptidske-

letts des Myoglobins zu  $\alpha$ -Helices verdreht sind. Es gibt genügend Hinweise dafür, daß viele Proteine helikale Bereiche enthalten.

### TERTIÄRSTRUKTUREN VON PROTEINEN SIND ÄUSSERST UNREGELMÄSSIG

Unter der *Tertiärstruktur* eines Proteins versteht man seine räumliche Gestalt. Sie ist in vielen Fällen sehr unregelmäßig. Kaum ein Protein liegt in der Form einer einfachen Helix vor; statt dessen enthalten sie meistens sowohl helikale als nichthelikale Bereiche. In einigen Proteinen scheinen helikale Regionen völlig zu fehlen. Es gibt eine Reihe von stereochemischen Gründen, warum die  $\alpha$ -Helix oder andere geordnete Strukturen nicht häufiger vorkommen, trotz der fast völlig regelmäßigen Anordnung von Wasserstoffbrücken im Skelett. Einer der Gründe ist, daß die Aminosäure Prolin keine Aminogruppe enthält und daher die regelmäßigen Wasserstoffbrücken dort unterbrochen werden müssen, wo Prolin vorkommt. Ein anderer Grund liegt in den Disulfidbrücken (S-S) zwischen Cysteinresten. Wenn die Cysteinreste derselben Polypeptidkette angehören, wird die Helix notwendigerweise verformt.

Die vielleicht wichtigste Ursache für die Unregelmäßigkeit der Proteinstrukturen ist der verschiedene chemische Charakter der Aminosäure-Seitenketten. Jede dieser Seitenketten ist bestrebt, die energetisch günstigsten schwachen Wechselwirkungen mit anderen atomaren Gruppen einzugehen. So wird z.B. die freie Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins bevorzugt eine Position einnehmen, in der sie Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen kann. Die beträchtliche Energie einer solchen Bindungen ginge verloren, wenn Tyrosin z.B. in der Nähe einer hydrophoben Isoleucinseitenkette läge.

Dazu kommt noch, daß die Seitenketten mehrerer Aminosäuren wie Valin und Leucin ziemlich wasserunlöslich sind, wogegen andere, wie Glutaminsäure oder Lysin, sehr gut wasserlöslich sind. Es ist daher chemisch einleuchtend, daß die wasserunlöslichen Seitenketten, aneinander gepackt, im Inneren des Myoglobinmoleküls vorkommen, wogegen an der Oberfläche Gruppen liegen, die sich leicht mit Wasser mischen können. Die 3-dimensionale Struktur stellt die energetisch günstigste Anordnung der Polypeptidkette dar. Jede spezifische Aminosäuresequenz nimmt die bestimmte «native» Anordnung an, die eine maximale Zahl günstiger Kontakte mit seiner natürlichen Umgebung ermöglichen. Ein sehr guter Beweis dafür wurde durch eindrucksvolle Versuche erbracht, in denen die native 3-D-Struktur durch hohe Temperatur oder andere unphysiologische Bedingungen zerstört (denaturiert) wurde, wobei ungeordnete, biologisch inaktive Polypeptidketten entstehen. Wenn die denaturierten Proteine vorsichtig wieder in ihre alte Umge-

bung gebracht werden, können einige ihre natürliche Konformation und volle biologische Aktivität zurückgewinnen (Renaturierung).

### **S-S-BRÜCKEN BILDEN SICH SPONTAN ZWISCHEN DEN RICHTIGEN PARTNERN**

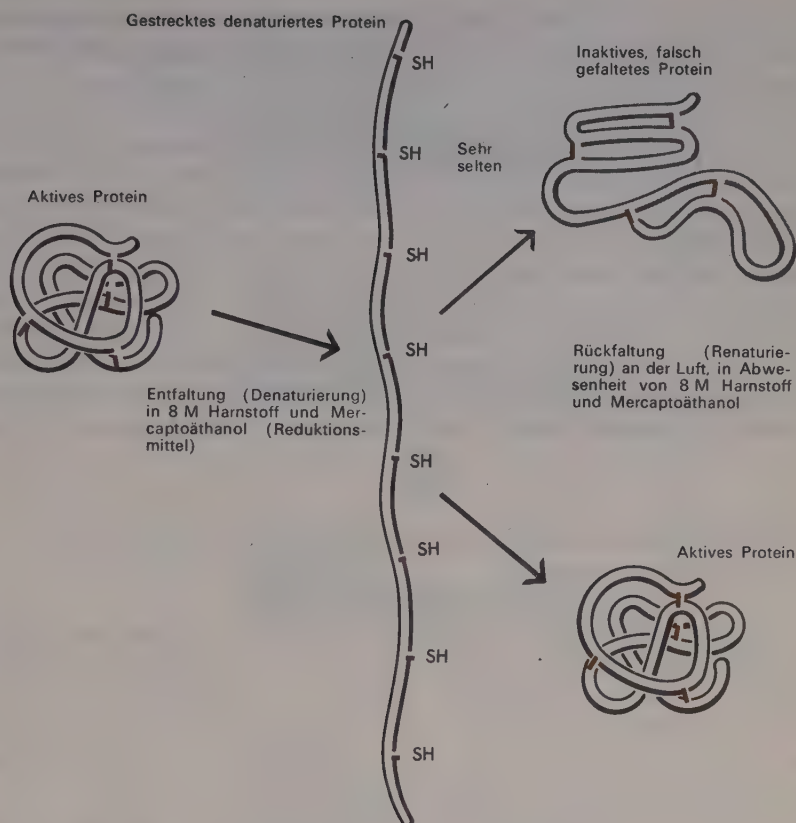
In vielen Fällen erfordert die Renaturierung eines ungeordneten Proteins zu seiner aktiven Form nicht nur die Wiederherstellung thermodynamisch günstiger sekundärer Wechselwirkungen, sondern auch die Bildung spezifischer Disulfid (S-S)-Brücken. Zum ersten Mal wurde das experimentell an dem Enzym Ribonuklease gezeigt, das aus einer Polypeptidkette mit 124 Aminosäuren besteht, die durch 4 spezifische Disulfidbrücken vernetzt ist. Man kann die native aktive Konfiguration dadurch zerstören, daß die S-S-Brücken in Gegenwart des Denaturierungsmittels 8 M Harnstoff und des Reduktionsagens Mercaptoäthanol zu Sulfhydryl (SH)-Gruppen reduziert werden (Abbildung 6-12). Wenn der Harnstoff wieder entfernt wird, reoxydieren die S-H-Gruppen an der Luft unter Bildung von S-S-Bindungen, die mit denen im Ausgangsprodukt identisch sind. Eine bestimmte SH-Gruppe reagiert nicht mit einer beliebigen der anderen sieben SH-Gruppen im Molekül, sondern mit der spezifischen SH-Gruppe, die durch die Faltung der Polypeptidkette in ihre nächste Nähe gebracht wird. Die S-S-Brücken sind daher nicht Ursache für die ganz besondere Faltung der Kette. Man sollte sie eher als Mittel betrachten, die Stabilität einer bereits stabilen Konfiguration noch weiter zu erhöhen. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von S-S-Bindungen hat nichts mit der Überlegung zu tun, daß die endgültige Struktur eines Proteins durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird.

### **ENZYME SIND NICHT IN DER LAGE, DIE AMINOSÄURESEQUENZ IN PROTEINEN ZU BESTIMMEN**

Wir haben gesehen, daß die Aminosäuresequenz in einer Polypeptidkette zum großen Teil die 3-dimensionale Anordnung bestimmt. Das führt uns zum Problem der richtigen Reihenfolge zurück, das das Kernproblem der Proteinsynthese ist. Im Vergleich dazu ist das Problem der Bindungsknüpfung selbst von geringerer Bedeutung, da bei der Verknüpfung ja immer wieder der gleiche kovalente Bindungstyp (die Peptidbindung) gebildet werden muß, woraus wir auf die Beteiligung nur eines oder höchstens einiger weniger Enzyme schließen können.

Andererseits kann die richtige Reihenfolge nicht unter Zuhilfenahme von Enzymen, die für jede Aminosäure im Protein spezifisch sind, getroffen





**ABBILDUNG 6-12** Schematische Darstellung der Reaktionsweise von S—S-Brücken während der Denaturierung und Renaturierung eines Proteins. Wenn die Denaturierungsmittel entfernt werden, nehmen die meisten Polypeptidketten ihre native Konfiguration mit den ursprünglichen S—S-Brücken wieder an. Nur wenige Polypeptidketten falten sich so, daß eine inaktive Form entsteht, in der die S—S-Brücken von denen des Ausgangsproduktes verschieden sind.

werden und zwar aus folgenden Gründen. Diese Methode würde so viele ordnende Enzyme erfordern wie Aminosäuren im Protein enthalten sind; da aber alle bekannten Enzyme selbst wieder Proteine sind, würden zusätzliche ordnende Enzyme für die Synthese der Enzyme notwendig werden und so weiter. Die Situation wäre offensichtlich paradox, wenn wir nicht eine aufs engste verflochtene Reihe von Synthesen postulieren wollen, in welchen jedes Protein mehrere verschiedene enzymatische Funktionen ausüben kann. Mit dieser Annahme könnte man sich vielleicht -aber auch nur mit großen Schwierigkeiten- eine funktionsfähige Zelle vorstellen. Es

scheint aber sehr unwahrscheinlich, daß die meisten Proteine mehr als eine bestimmte Aufgabe haben. Alles, was wir bisher wissen, weist ganz im Gegenteil darauf hin, daß ein Protein auch nur eine Funktion hat.

Man muß daher die Idee, daß die Aminosäuren durch Enzyme richtig gereiht werden, verwerfen und statt dessen eine ganz bestimmte Oberfläche, die Matrize, (Templatè, Abbildung 6-13) postulieren, die die verschiedenen Aminosäuren (oder deren aktivierte Derivate) anzieht und so zu einer korrekten Anordnung führt. Dann könnte ein spezifisches Enzym, das für alle Proteine zuständig wäre, die Peptidbindung knüpfen. Außerdem muß man annehmen, daß die Matrizen die Fähigkeit besitzen, direkt oder indirekt als Muster für sich selbst (Selbstreplikation) zu dienen. Das heißt, diese spezifischen Oberflächen müssen in irgendeiner Weise genau kopiert werden, um neue Matrizen zu ergeben. Auch hier können wir nicht mit der Hilfe spezifischer Enzyme rechnen, da wir sonst wieder auf das Paradoxon «Enzyme können keine Enzyme machen» zurückkämen.

#### MATRIZEN WECHSELWIRKUNGEN BERUHEN AUF SCHWACHEN WECHSELWIRKUNGEN

Die Existenz von Enzymen verlangt also gleichzeitig die Existenz von hochspezifischen Matrizenmolekülen. Zusätzlich müssen die Matrizen selbst Makromoleküle sein, mindestens so groß wie ihre Polypeptidprodukte. Das wird einem klar, wenn man untersucht, nach welchen Regeln die selektive Bindung kleiner Moleküle an die Matrizen erfolgt. Man sieht sofort, daß stabile kovalente Bindungen keine Rolle spielen können. Statt dessen beruht die Anziehung auf relativ schwachen Wechselwirkungen, die auch ohne Enzyme stattfinden können. Dazu gehören erstens ionische Bindungen, zweitens Wasserstoff-Brückenbindungen, bei denen das elektropositive Wasserstoffatom durch elektronegative Atome wie Sauerstoff oder Stickstoff angezogen wird und drittens van der Waals-Kräfte.

Da alle diese Kräfte nur über sehr kleine Entfernungen wirken ( $< 5 \text{ \AA}$ ) können Matrizenoberflächen kleine Moleküle nur dann in der richtigen Reihenfolge anordnen, wenn die Atome in nahen Kontakt kommen. Man kann daher erwarten, daß die spezifischen (anziehenden) Gruppen der Matrize von gleicher Größenordnung sind wie die Aminosäure-Seitenketten des Proteinprodukts.

#### ANZIEHUNG ZWISCHEN GEGENSÄTZLICHEM ODER ANNÄHERUNG VON GLEICHEM

Wir stellen hier die naheliegende Frage: kann eine Polypeptidkette als Matrize für ihre eigene Synthese dienen? Wenn das möglich wäre, würde es die

*"Kleine Kräfte" wirken nur bis ca.  $5 \text{ \AA}$*

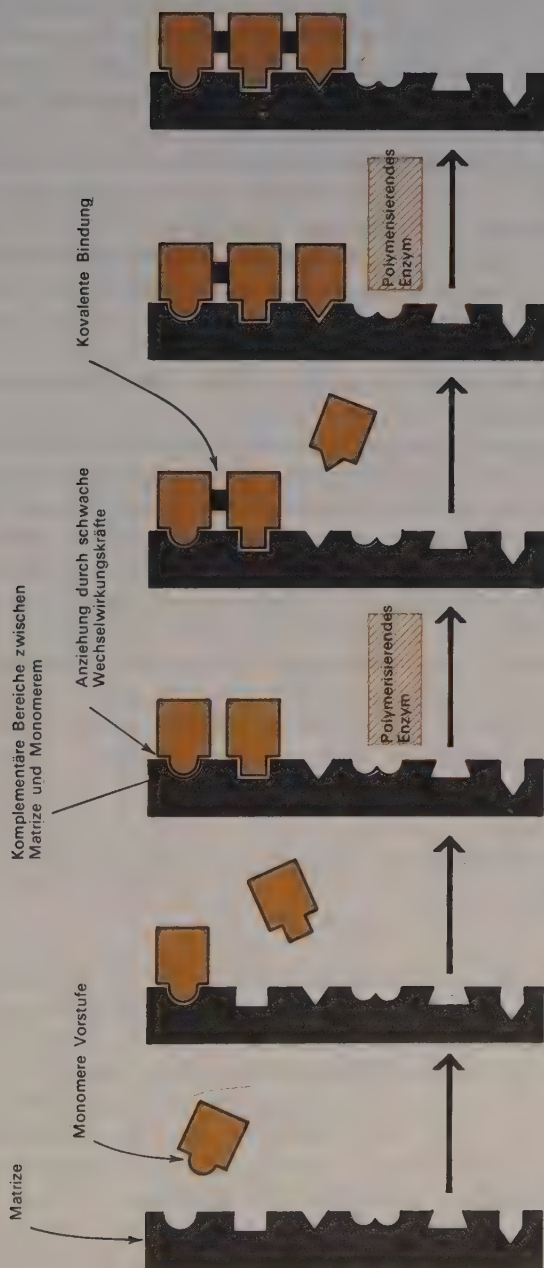


ABBILDUNG 6-13 Schematische Darstellung der Bildung eines spezifischen polymeren Moleküls an einer Matrizenoberfläche.

chemischen Voraussetzungen für das Leben wesentlich vereinfachen. Das Problem der Proteinsynthese und der Replikation der Matrize wäre dann dasselbe und der zusätzliche biochemische Aufwand, der sich aus der Notwendigkeit spezieller Matrizen ergibt, wäre überflüssig. Diese theoretische Möglichkeit hält jedoch einer näheren Betrachtung der Aminosäure-Seitenketten nicht stand. Es gibt keinen chemischen Grund dafür, daß z.B. ein Valinrest auf einer Matrize die spezifische Seitenkette eines anderen Valinmoleküls bevorzugt anziehen sollte. Tatsächlich besitzt keine der Aminosäure-Seitenketten eine spezifische Affinität für die gleiche Seitenkette. Es ist statt dessen viel einfacher, sich Moleküle mit gegensätzlichen oder komplementären Eigenschaften vorzustellen, die einander anziehen. Negativ geladene Gruppen ziehen offensichtlich positiv geladene an und Wasserstoffatome können nur mit elektronegativen Atomen Wasserstoffbrücken bilden. Auch durch van der Waals-Kräfte können sich Moleküle nur dann anziehen, wenn die Partner komplementäre Gestalt besitzen, sodaß eine Vertiefung in einem Molekül durch eine herausragende Gruppe eines anderen Moleküls ausgefüllt werden kann.

Es gibt formal noch einen Ausweg, die Möglichkeit von Proteinmatrizen zu retten. Wir könnten uns 20 verschiedene spezifische Moleküle vorstellen, die wir als Übergangsstücke bezeichnen wollen. Jedes könnte zwei identische Oberflächen aufweisen, die in Ladung und/oder Form einer gegebenen Aminosäure komplementär wären. Unter Zuhilfenahme dieser Übergangsstücke könnten die Aminosäuren in einer Sequenz angeordnet werden, die identisch mit der der Matrizenpolypeptidkette wäre. Es gibt aber keinerlei Hinweise dafür, daß solche Verbindungen tatsächlich existieren. Wir werden statt dessen in Kürze sehen, daß es tatsächlich eine spezielle Klasse von Matrizenverbindungen (die Nukleinsäuren) gibt.

## **EIN CHEMISCHES ARGUMENT GEGEN DIE EXISTENZ VON PROTEINMATRIZEN**

Der Aufbau der Aminosäure-Seitenketten dürfte der Grund dafür sein, daß Proteine keine Rolle als Matrizen spielen. Man könnte anführen, daß keine Matrize, deren Spezifität von den Seitenketten so nahe verwandter Aminosäuren wie Valin oder Alanin abhängt, mit einer Genauigkeit kopiert werden kann, wie sie für die Existenz einer Zelle notwendig ist. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß einige Aminosäuren chemisch sehr ähnlich sind. Valin und Isoleucin unterscheiden sich z.B. nur durch eine zusätzliche Methylgruppe im Isoleucin. Auch Glycin und Alanin unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe. Diese chemische Ähnlichkeit führt sofort zu der Frage, ob irgendein Kopiervorgang ausreichend genau sein kann, um zwischen zwei



so ähnlichen Molekülen zu unterscheiden. Die Antwort hängt natürlich davon ab, was wir unter «ausreichend genau» verstehen. Eine vernünftige Schätzung wäre, daß jede Aminosäure in einem vererbaren Molekül mit einer Genauigkeit von weniger als einem Fehler pro  $10^8$  kopiert werden muß. Andererseits kann man aufgrund von halbquantitativen chemischen Überlegungen annehmen, daß es keine chemische Reaktion gibt, die zwischen Molekülen, die sich nur durch eine Methylgruppe unterscheiden, mit einer größeren Genauigkeit als 1 in  $10^6$  diskriminieren kann. Wenn wir nun die Genauigkeit der Proteinsynthese selbst betrachten, sehen wir, daß manche Aminosäuren nur mit 99,9 prozentiger Sicherheit eingebaut werden. Proteine scheinen also als Grundlage für die Vererbung ungeeignet.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Der rasche Ablauf der meisten chemischen Reaktionen in einer Zelle hängt von der Anwesenheit spezifischen Enzyme und äußerer Energielieferanten (Sonne oder Nährstoffmoleküle) ab, die für die Synthese von ATP und ähnlichen Molekülen notwendig sind. Für fast jede Reaktion, die für die Synthese eines kleinen Moleküls gebraucht wird, gibt es ein spezifisches Enzym. Dieses Gesetz gilt auch, wenn das «kleine Molekül» so groß wie Chlorophyll ist. Es erhebt sich jedoch das Problem, ob das gleiche Prinzip auch für die Biosynthese der Enzyme selbst gilt. Wird eine Anzahl spezifischer Enzyme für die Synthese jedes Enzyms verwendet, das am Stoffwechsel kleiner Verbindungen beteiligt ist? Diese Zahl müßte sehr groß sein, da alle Enzyme Proteine sind, also selbst sehr große Moleküle, die durch lineare Verknüpfung 20 verschiedener Aminosäuren in ganz bestimmter Reihenfolge entstehen. Ein durchschnittliches Protein enthält 300 bis 500 Aminosäuren und eine entsprechende Anzahl von Enzymen wäre daher notwendig, wenn Enzyme die spezifische Aminosäuresequenz bestimmen könnten.*

*Dieses Schema ist offensichtlich unbrauchbar. Die Reihung der Aminosäuren wird statt dessen durch Matrizen erreicht. Die Matrizen für Proteine sind ebenfalls Makromoleküle. Ihre Oberflächen ziehen Aminosäuren spezifisch an und ordnen sie dadurch in der richtigen Reihenfolge. Für jedes bestimmte Protein gibt es eine bestimmte Matrize. An der Anziehung der Aminosäure durch die Matrizenoberfläche sind keine Enzyme beteiligt, sondern sie beruht auf schwachen sekundären Kräften. Spezifische Regionen auf der Matrize ziehen jeweils eine der 20 Aminosäuren spezifisch an.*

*Wenn eine Zelle wächst und sich teilt, muß sich auch die Zahl der Proteinmatrizen verdoppeln. Matrizen müssen auf irgendeine Weise auch als Matrizen für ihre eigene, exakte Synthese dienen. Die Matrizen sind keine Proteine; es gibt chemische Argumente, warum Proteine keine hochspezifischen Matrizen*

sein können. Alle Zellen enthalten statt dessen eine besondere Klasse von Molekülen, deren spezifische Aufgabe es ist, als Matrizen für die Proteinsynthese zu dienen.

## LITERATUR

- Kornberg, A. «Pathways of Enzymatic Synthesis of Nucleotides and Polynucleotides», in W. D. McElroy und B. Glass (Eds.), *The Chemical Basis of Heredity*, Johns Hopkins, Baltimore, 1957, S. 579-608. Eine ausgezeichnete Übersicht über die Biosynthese der Purin- und Pyrimidinnukleotide.
- Perutz, M. F., «The Hemoglobin Molecule», *Sci. Am.*, November, 1964, S. 64-76. Enthält einen Großteil dessen, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt über die Struktur des Hämoglobinmoleküls in Anwesenheit und Abwesenheit von Sauerstoff bekannt ist.
- Dickerson, R. E., und I. Geis, *The Structure and Action of Proteins*, Harper and Row, New York, 1969. Eine besonders gut illustrierte Einleitung in die Art und Weise, wie Polypeptidketten sich falten.
- Neurath, H. (Ed.), *The Proteins*, 2. Aufl., Academic, New York, Band 1, 1963, Band 2, 1965. Eine Sammlung fortgeschrittener Artikel über verschiedene Aspekte der Proteinchemie.
- Muller, H. J., «The Gene», *Proc. Roy. Soc. (London)*, **B134**, 1-37 (1947). Ein Vortrag aus dem Jahr 1945, in dem ein bekannter Genetiker die Geschichte des Gen-Konzepts zurückverfolgt und darüber spekuliert, wie es als Matrize dienen könnte.
- Phillips, D., «The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule», in R. H. Haynes and P. C. Hanawalt (Eds.), *The Molecular Basis of Life*, Freeman, San Francisco, 1968, S. 52-64. Eine Beschreibung der ausgezeichneten Arbeiten, durch die die Struktur von Lysozym aufgeklärt wurde, des ersten Enzyms, bei dem es gelang, Struktur und Funktion zu korrelieren.
- Mahler, H. R., und E. H. Cordes, *Biological Chemistry*, Harper and Row, New York, 1966.
- Bernhard, S., *Enzymes: Structure and Function*, Benjamin, New York, 1968. Eine kurze aber ausgezeichnete Einführung in die Rolle der Proteine als Enzyme.

# 7

## DIE ANORDNUNG DER GENE AUF DEN CHROMOSOMEN

Unsere chemische Intuition sagt uns, daß Proteine wahrscheinlich nicht die Matrizen sein können, die für die richtige Reihung der Aminosäuren in den Proteinen verantwortlich sind. Wir müssen uns daher nach einer Klasse von Molekülen umsehen, die sowohl als Matrize für Proteine dienen als auch sich selbst replizieren kann. Die moderne Genetik hat die Richtung, in der wir suchen müssen, festgelegt. Dieser erfolgreiche Wissenschaftszweig hat in erstaunlichen Einzelheiten gezeigt, auf welche Weise die Chromosomen für die Vererbung verantwortlich sind: die Gene, die auf den Chromosomen lokalisiert sind, führen dazu, daß Tochterzellen den Elternzellen gleichen. Die Hauptaufgabe der Genetik war es, zu erklären, wie diese Ähnlichkeit zustande kommt.

Gleichzeitig mit der Kartierung der Gene untersuchten die Genetiker die grundlegende Frage, wie die Gene überhaupt spezifische zelluläre Vorgänge kontrollieren können. Im allgemeinen konnten jedoch die Mutationen, die sie untersuchten, nur schwer analysiert werden. In den 20er und 30er Jahren —und auch heute noch— wußte man praktisch nichts über die biochemischen Grundlagen der Entwicklung.

Glücklicherweise konnten die Mutationen, die die Farben von Blüten und Augen kontrollieren, chemisch untersucht werden. So verändern z.B. Mutationen in vielen Genen die Augenfarbe der *Drosophila*. In diesem Fall konnte man eine biochemische Analyse durchführen, da bekannt war, daß die Augenfarbe auf die Anwesen-

heit bestimmter farbiger Moleküle, der Pigmente, zurückzuführen ist. Man konnte daher die Frage stellen, wie ein Unterschied in den Genen die Augenfarbe der Fruchtfliege von weiß nach rot verändern könnte. Die offensichtliche und richtige Antwort ist, daß in den Augen der Mutantenfliegen kein Pigment enthalten ist. Daraus kann man weiterhin schließen, daß ein Enzym, das für die Synthese des Pigments notwendig ist, fehlt. Aus dieser Überlegung entwickelte sich die allgemeine Hypothese, daß Gene direkt die Synthese aller Proteine kontrollieren, ob diese nun Enzyme sind oder nicht.

Sobald diese Vorstellungen allgemein akzeptiert wurden (um 1946), begannen die Genetiker sich mit der Frage zu befassen, auf welche Weise ein Gen die speziellen Proteine bestimmen kann. Der Fortschritt war nur gering bis die Chemiker in den frühen 50er Jahren eindeutig nachwiesen, daß Proteine lineare Polymere aus den 20 Aminosäuren sind. Für die Theoretiker unter den Genetikern war dann der Schluß naheliegend, daß die Chromosomen die genetische Information tragen, die die Aminosäuresequenz bestimmt. Sie sagten voraus, daß Untersuchungen der Genstruktur zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Matrizen, die die Aminosäuren richtig reihen, führen würden. Genau das trat auch wirklich ein. Bevor wir uns mit diesem Problem näher beschäftigen können, müssen wir jedoch einige Grundlagen der Genetik besprechen.

## **WIR MÜSSEN NOCH VIEL ÜBER DIE MOLEKULAREN GRUNDLAGEN DER CHROMOSOMENSTRUKTUR LERNEN**

Sogar heute noch sind unsere Kenntnisse über die Molekülstruktur der Chromosomen sehr unvollständig. Dies gilt besonders für die komplexen Strukturen der Chromosomen höherer Pflanzen und Tiere. Es gibt Beweise, auf die wir später zurückkommen werden, daß die hauptsächlich chemische Komponente bakterieller und viraler Chromosomen Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist. Die Chromosomen höherer Organismen enthalten jedoch zusätzlich eine beträchtliche Menge (bis zu 50 %) Protein.

Ein Großteil dieser Proteine gehört zur Klasse der Histone. Alle Histone sind basische Verbindungen (tragen positive Ladungen) und man nimmt an, daß sie einen Teil der negativen Ladung der sauren DNA-Moleküle neutralisieren. Die Hauptaufgabe der Histone ist noch reichlich ungeklärt. Vor 1943 glaubten viele Biologen, daß sie genetische Information enthielten; ihre völlige Abwesenheit in vielen oder allen Bakterien spricht aber gegen eine fundamentale genetische Rolle. Man neigt nun mehr und mehr dazu, ihnen eine gewisse Hemmwirkung zuzuschreiben. Wenn ein Gen höherer Pflanzen und Tiere inaktiv ist, ist es im allgemeinen mit einem Histon verbunden.



Bis jetzt ist es auch mit Hilfe des Elektronenmikroskops nicht gelungen, einen Einblick in die Struktur der Chromosomen höherer Organismen zu erhalten. Dieser Mißerfolg steht im auffallenden Gegensatz zu den Erfolgen, die mit sehr dünnen Schnitten von Muskel- und Nervenfasern erzielt wurden. Er beruht hauptsächlich auf der *unregelmäßigen* Gestalt der Chromosomen, und zwar nicht nur der langgestreckten während der Interphase, sondern sogar der kontrahierten Metaphasechromosomen. Molekular betrachtet sind die verschiedenen Muskelpoteine schön regelmäßig in parallelen Zonen angeordnet. Der Verlauf eines Chromosoms in einer Zelle ist dagegen äußerst unregelmäßig: Bei Betrachtung dünner Schnitte war es bisher unmöglich, auch nur die Kontur zu verfolgen, geschweige denn Details über die Molekülstruktur zu beobachten. Die rein morphologische Betrachtung lieferte also keine Anhaltspunkte über die chromosomale Anordnung der Gene; genetische Kreuzungsversuche sind die einzige Möglichkeit, das Problem anzugehen. Glücklicherweise ist das Auflösungsvermögen dieser Methode, wie wir bald sehen werden, sehr gut.

## GENETISCHE KREUZUNGEN

Die Natur hat verschiedene Wege, um genetisches Material aus verschiedenen Organismen zusammenzubringen (genetische Kreuzungen) und so genetische Rekombinationen zu erzielen. Diese Wege, zusammenfassend *geschlechtliche Vorgänge* genannt, beschleunigen die Evolution in großem Maß, da sie eine Ansammlung günstiger Mutationen viel rascher in eine Zelle bringen als es durch aufeinanderfolgende Zyklen günstiger Mutationen alleine geschehen könnte. Wir wollen uns hier aber nicht mit den Vorteilen der verschiedenen Geschlechtsvorgänge für die Evolution beschäftigen. Unser Interesse an ihnen liegt nur in der Vielfalt von Möglichkeiten, die uns damit in die Hand gegeben wurden, um die Lokalisierung von Genen auf Chromosomen zu untersuchen.

Der Trick bei der Lokalisierung von Genen mittels genetischer Kreuzungen beruht darauf, daß man untersucht, ob Gene, die von einem Elternteil stammen, bei der Bildung der haploiden segregierenden Tochterzellen zusammenbleiben. Wenn Gene auf verschiedenen Chromosomen liegen, werden sie sich willkürlich kombinieren und die Wahrscheinlichkeit, sie in einem haploiden Abkömmling gemeinsam vorzufinden, ist 50:50. Wenn sie hingegen auf demselben Chromosom liegen, werden sie eher beisammen bleiben, außer wenn sie durch Crossing-over getrennt wurden.

Das Crossing-over findet während des Stadiums der Meiose statt, bei dem zwei homologe Chromosomen einander spezifisch anziehen und Paare bilden. Der Mechanismus dieser Anziehung (Paarung) liegt noch völlig im

Dunkeln. Es muß ein hochspezifischer Prozeß sein, da er nur zwischen Chromosomen abläuft, die die gleichen Gene enthalten. Anschließend an die Paarbildung brechen die beiden Chromosomen manchmal an der gleichen Stelle auseinander und vereinigen sich kreuzweise wieder. Dadurch können Rekombinantenchromosomen gebildet werden, die einige Gene vom väterlichen und einige vom mütterlichen Chromosom enthalten. Crossing-over erhöht die Zahl der genetischen Rekombinationen wesentlich und man kann sie, abgesehen von ganz speziellen Fällen, allgemein beobachten. Die Häufigkeit des Crossing-over variiert jedoch stark von Spezies zu Spezies. Im Durchschnitt treten bei jeder Chromosomenpaarung ein bis mehrere Fälle von Crossing-over auf.

Alle früheren Ergebnisse über die Lokalisation von Genen stammen aus Untersuchungen über die Segregation von Genen nach der üblichen meiotischen Teilung. Es wurden Organismen untersucht, bei denen durch Zellverschmelzung der männlichen und weiblichen Zelle eine diploide Zelle entsteht, in der die Hälfte der Chromosomen vom väterlichen und die andere Hälfte vom mütterlichen Elternteil stammt. Während der Meiose wird die diploide Chromosomenzahl immer auf die haploide Zahl reduziert. Das Crossing-over findet immer statt, nachdem jedes der parental Chromosomen sich in zwei Chromatide gespalten hat, die durch ein einziges Zentromeres zusammengehalten werden. An jedem Crossing-over sind zwei Chromatide beteiligt, sodaß jedes Crossover Produkt zwei Rekombinantenchromatide liefert, wobei zwei Elternchromosomen intakt bleiben (Abbildung 7-1). (Das bedeutet jedoch nicht, daß die Hälfte der Chromatide, die während der Meiose gebildet werden, den parental Genotyp besitzen. Jedes Chromatid eines Paares beteiligt sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit an einem Crossing-over, sodaß selbst wenn ein bestimmtes Chromatid an einem bestimmten Crossing-over nicht beteiligt ist, es doch an einem anderen teilnehmen kann.)

## KARTIERUNG VON CHROMOSOMEN

Das Auftreten von Crossing-over-Vorgängen gibt uns die Möglichkeit, Gene auf einem Chromosom zu lokalisieren. Crossing-over erfolgt ganz zufällig auf der ganzen Länge der Chromosomen: Je weiter zwei Gene also voneinander entfernt sind, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß zwischen ihnen eine Bruchstelle auftritt und eine genetische Rekombination möglich ist. Man kann direkt die Häufigkeit verschiedener Klassen von Rekombinanten für die Lokalisation der Gene verwenden, vor allem dann, wenn die Nachkommenschaft haploid ist und das Problem von Dominanz gegenüber Rezessivität wegfällt. Man betrachte als Beispiel die Segregation dreier

Zwei gepaarte homologe Chromosomen  
in einer diploiden Zelle

Gen  
Gen

Zentromeres

Gen  
Gen

Duplikation der Chromosomen  
unter Bildung zweier Chroma-  
tide

Chromatid

Paarung homologer Chromosomen;  
Crossing-over zwischen einem Chro-  
matidenpaar

Erste meiotische Teilung

4 haploide Zellen

Duplikation von Zen-  
tromeren, gefolgt von  
der 2. meiotischen  
Teilung

ABBILDUNG 7-1 Crossing-over zwischen homologen Chromatiden während der Meiose.

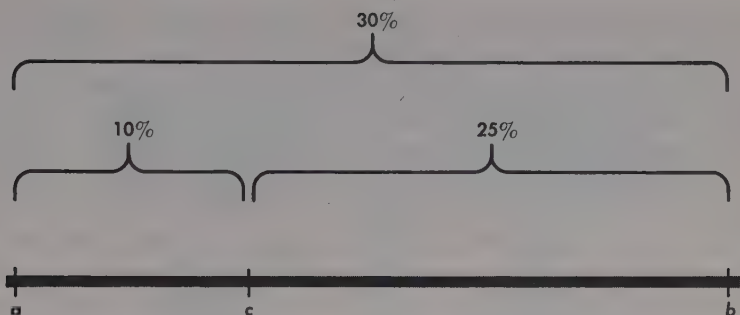
Gene, die alle auf demselben Chromosom eines haploiden Organismus liegen. Die Anordnung der Gene kann durch drei Kreuzungen ermittelt werden, bei denen jeweils zwei Gene untersucht werden (Zwei-Faktor-Kreuzung). Eine Kreuzung X zwischen  $a^+b^+$  und  $ab$  gibt vier verschiedene Nachkommen: die beiden parental Genotypen ( $a^+b^+$  und  $ab$ ) und zwei Rekombinanten-Genotypen ( $a^+b$  und  $ab^+$ ). Die Kreuzung Y zwischen  $a^+c^+$  und  $ac$  gibt analog dazu die zwei parental Kombinationen sowie  $a^+c$  und  $ac^+$ -Rekombinanten, wogegen die Kreuzung Z zwischen  $b^+c^+$  und  $bc$  parentale Typen und die Rekombinanten  $b^+c$  und  $cb^+$  ergibt. Jede Kreuzung führt zu einem bestimmten Verhältnis zwischen parental und rekombinierter Nachkommenschaft. Wir wollen als Beispiel annehmen, daß die Kreuzung X 30% Rekombinanten gibt, Y 10% und Z 25%. Wir können dieses Ergebnis als Hinweis dafür auswerten, daß die Gene  $a$  und  $c$  näher beieinander liegen als  $a$  und  $b$  oder  $b$  und  $c$  und daß die Genabstände zwischen  $a$  und  $b$  und  $b$  und  $c$  ähnlicher sind. Eine Genanordnung  $acb$  entspricht am besten diesen Ergebnissen (Abbildung 7-2).

Die Richtigkeit der Genfolge, die man aus Zwei-Faktor-Kreuzungen erhält, kann gewöhnlich durch Drei-Faktor-Kreuzungen eindeutig bestätigt werden. Wenn die 3 Gene des obigen Beispiels in der Kreuzung  $a^+b^+c^+ \times abc$  verfolgt werden, findet man 6 Rekombinanten-Genotypen (Abbildung 7-3). Sie fallen in 3 Gruppen reziproker Paare. Die seltenste Gruppierung entsteht durch ein doppeltes Crossing-over. Durch Ermittlung der seltensten Klasse kann man häufig sofort eine postulierte Anordnung bestätigen (oder widerlegen). Die Ergebnisse, die in Abbildung 7-3 dargestellt sind, bestätigen die Anordnung auf die schon die Zwei-Faktor-Kreuzung hingewiesen hatte. Nur wenn die Anordnung  $acb$  ist hat das Ergebnis, daß die seltensten Rekombinanten  $a^+cb^+$  und  $ac^+b$  sind, einen Sinn. Mehrfaches Crossing-over bedeutet, daß die Häufigkeit der Rekombination ( $ab$ ) zwischen den äußeren Markierungsgenen (Markern)  $a$  und  $b$  gewöhnlich kleiner ist als die Summe der Rekombinationshäufigkeiten ( $ac$  und  $cb$ ) zwischen  $a$  und  $c$  und  $c$  und  $b$ . Um eine genauere Abschätzung des Abstandes zwischen den äußeren Markierungsgenen vornehmen zu können, berechnet man die Wahrscheinlichkeit ( $ac \times cb$ ), mit der ein Crossing-over zwischen  $c$  und  $b$  gleichzeitig mit einem  $ac$  Crossing-over stattfindet und umgekehrt ( $cb \times ac$ ). Wenn man diese Wahrscheinlichkeit von der Summe der Rekombinationshäufigkeiten abzieht, bekommt man einen genaueren Wert für die Rekombinationshäufigkeit. Man erhält die einfache Formel

$$ab = ac + cb - 2(ac)(cb)$$

Sie ist in allen Fällen anwendbar, in denen ein Crossing-over nicht die Häufigkeit eines anderen Crossing-over beeinflußt. Leider wird die genaue

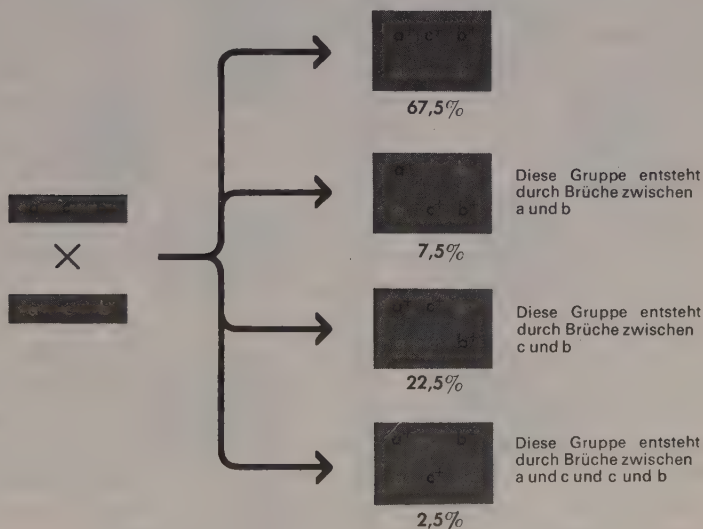




**ABBILDUNG 7-2** Versuchswise Reihung dreier Gene aufgrund dreier Zwei-Faktor-Kreuzungen (Details im Text):

Kartierung häufig durch Interferenzphänomene gestört, durch welche die Häufigkeit eines Crossing-over durch ein zweites entweder erhöht oder vermindert werden kann.

Die Ergebnisse einer großen Zahl solcher Kreuzungsversuche haben zu einer wichtigen Schlußfolgerung für die Genetik geführt: alle Gene eines



**ABBILDUNG 7-3** Anwendung von Drei-Faktor-Kreuzungen für die Reihung von Genen. Das seltenste Paar reziproker Rekombinanten muß durch ein doppeltes Crossover entstehen. Die für die verschiedenen Klassen angeführten Prozentwerte sind theoretische Werte für unendlich große Gruppen. Wenn man eine endliche Zahl der Nachkommenschaft beobachtet, unterliegen die genauen Werte zufälligen statistischen Variationen.

Chromosoms liegen auf einer Geraden. Die Anordnung der Gene ist streng linear, nie verzweigt. Chromosomen sind daher nicht nur in Bezug auf die Gestalt, sondern auch bezüglich der Genanordnung linear. Die Anordnung von Genen auf einem bestimmten Chromosom nennt man die *Genkarte*, der Vorgang der Lokalisation von Genen auf Chromosomen wird häufig als Kartierung von Genen bezeichnet. Abbildung 7-4 zeigt die Genkarte eines der *Drosophila*-Chromosomen. Die Abstände zwischen Genen auf einer Karte werden gewöhnlich in Karteneinheiten gemessen, welche in Beziehung zur Rekombinationshäufigkeit zwischen Genen stehen: wenn die Rekombinationshäufigkeit zwischen zwei Genen 5% beträgt, sagt man also, daß die Gene durch 5 Karteneinheiten voneinander getrennt sind. Wegen der Möglichkeit eines doppelten Crossing-over ist die Zuordnung von Karteneinheiten nur dann genau, wenn Rekombinationen zwischen nahe benachbarten Genen verfolgt werden.

Auch wenn Gene auf entgegengesetzten Enden eines sehr langen Chromosoms liegen, werden sie nicht weniger als 50 % Kopplung zeigen (in 50 % der Fälle zusammenbleiben), da es multiples Crossing-over gibt. Die Gene werden voneinander getrennt werden, wenn 1, 3, 5, 7... Crossing-over-Vorgänge zwischen ihnen stattfinden; sie bleiben zusammen, wenn es zu 2, 4, 6, 8... Crossing-over-Vorgängen kommt. Zu Beginn einer genetischen Analyse eines Organismus kann man daher fast unmöglich sagen, ob 2 Gene auf verschiedenen Chromosomen oder auf entgegengesetzten Enden eines langen Chromosoms liegen. Nach Kartierung einer großen Zahl von Genen findet man häufig, daß 2 Gene, von denen man ursprünglich glaubte, daß sie zu verschiedenen Chromosomen gehörten, in Wirklichkeit auf ein und demselben Chromosom liegen. So glaubte man z.B. viele Jahre, daß die Gene des T4-Phagen auf 3 verschiedenen Chromosomen angeordnet wären, bis man durch weitere Kartierung mit Hilfe neu entdeckter Gene fand, daß alle Gene auf einem einzigen Chromosom liegen.

Man muß sich vor Augen halten, daß eine Genkarte, die aus Rekombinationshäufigkeiten abgeleitet wurde, nur die relative Entfernung zwischen 2 mutierbaren Stellen wiedergibt. Den wirklichen physikalischen Abstand würde sie nur dann geben, wenn die Wahrscheinlichkeit für Crossing-over über die gesamte Länge des Chromosoms die gleiche wäre. Sobald die Genetiker mit Kartierungen begonnen hatten, suchten sie daher Methoden, mit deren Hilfe man die Mutationsorte mit physikalisch determinierten Stellen identifizieren könnte. Es gibt heute eine Reihe von Methoden, von denen einige zu kompliziert sind, um hier diskutiert zu werden, die zeigen, daß in vielen, aber nicht in allen Fällen, Genkarten ein gutes Bild der tatsächlichen Chromosomenstruktur geben. Eine dieser Methoden werden wir in einem späteren Abschnitt beschreiben, wenn wir uns mit der Genkarte von *E. coli* beschäftigen.

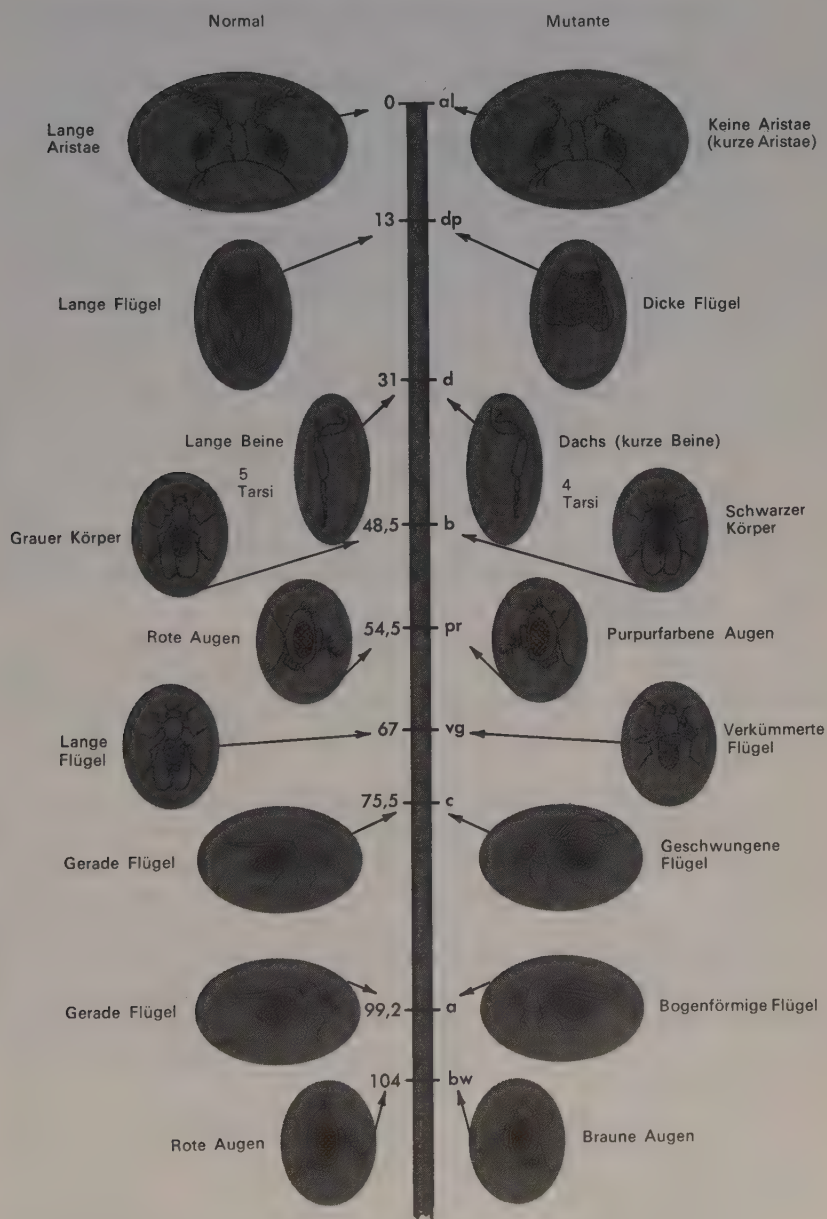


ABBILDUNG 7-4 Ausschnitt aus der Genkarte von *Drosophila melanogaster* (Chromosom 2).

## BEDEUTUNG DER UNTERSUCHUNGEN VON MIKROORGANISMEN

Ein Großteil der ursprünglichen Vorstellungen über Gene stammte aus Versuchen mit großen multizellulären Pflanzen und Tieren. Heute zieht man es jedoch vor, Mikroorganismen zu untersuchen, falls keine wirtschaftliche oder soziale Notwendigkeit besteht, Information über eine bestimmte Spezies zu erhalten (wie z.B. Mais, Mensch). Viele bedeutende Vorteile sprechen für die Verwendung von Mikroorganismen. Erstens sind sie im allgemeinen haploid, sodaß das Problem, ob eine Mutation dominant oder rezessiv ist, entfällt. Da die meisten Mutationen rezessiv sind, kann man sie nicht nachweisen, wenn das normale Wildtyp-Gen ebenfalls anwesend ist. Bei Arbeiten mit diploiden Zellen muß man häufig über mehrere Generationen hinweg genetische Kreuzungen durchführen, um die Anwesenheit eines bestimmten Mutantengens nachweisen zu können; in einer haploiden Zelle kann sich die Mutation praktisch sofort ausdrücken. Zweitens vermehren sich Mikroorganismen sehr rasch. Es ist äußerst vorteilhaft, mit einem Organismus wie z.B. Bakterien zu arbeiten, der alle 20 Minuten eine neue Generation hervorbringt, statt mit einer Pflanze wie Mais, bei der man im günstigsten Fall, in tropischer Umgebung, nur 2 Generationen im Jahr untersuchen kann.

Vor 50 Jahren erschien die *Drosophila* mit ihrem durchschnittlichen Lebenszyklus von 14 Tagen sehr geeignet. Das System ist jedoch nicht einfach genug, um eine Antwort auf die heute interessanten, fundamentalen Fragen über die Molekularbiologie der Gene und ihrer Funktionsweise zu geben.

Die interessantesten Organismen für genetische Untersuchungen sind heute Hefen, Schimmelpilze, Bakterien und Viren -besonders die Bakterien-viren oder Phagen. Erfolgreiche genetische Untersuchungen dieser Systeme begannen vor ca. 25 Jahren. Bis dahin hielt man es für einen ungeheueren Nachteil, daß sie so klein waren. Mikroorganismen haben keine leicht über-schaubaren morphologischen Eigenschaften wie z.B. rote Augen, und es war daher sehr schwierig festzustellen, ob sie Mutationen enthielten oder nicht. Bis 1945 glaubte man allgemein, daß einige von ihnen keine Chromosomen hätten und manche Biologen hatten sogar den Verdacht, daß sie nicht einmal Gene besäßen.

## DIE BEDEUTUNG VON MUTAGENEN

Die meisten Mutationen, die die Genetiker der Mendelschen Schule untersuchten, waren spontan entstanden. Heute verwendet man immer häufiger Mutationen, die durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung, UV-Licht



und verschiedene Chemikalien hervorgerufen werden. Diese Agenzien, die man zusammenfassend Mutagene nennt, haben die Isolierung von Mutanten sehr beschleunigt. Viele Jahre hindurch waren die verschiedenen Arten von Strahlungen die stärksten bekannten Mutagene. Heutzutage verwendet man häufiger chemische Mutagene, da sie einen viel größeren Anteil mutierter Gene hervorrufen. Behandlung von Bakterien mit dem äußerst reaktiven Nitrosoguanidin kann bei fast 1 % aller bakteriellen Gene lebensfähige Mutationen erzeugen.

Mutagene wirken ziemlich wahllos. Man kennt bis heute noch kein Mutagen, das die Mutationswahrscheinlichkeit eines bestimmten Gens erhöht ohne gleichzeitig auch die aller anderen Gene zu erhöhen. Bis vor kurzem war der Mechanismus der Mutagenese völlig unbekannt. Die Erkenntnis, daß DNA das primäre genetische Material ist, erlaubt jedoch heute die Entwicklung genauer Hypothesen über den Einfluß verschiedener Mutagene. (Wegen Details siehe Kapitel 9).

#### MUTATIONEN BEI BAKTERIEN: VERWENDUNG VON WACHSTUMSFAKTOREN

Der entscheidende Durchbruch bei der Verwendung von Bakterien als genetische Studienobjekte gelang 1944, als man erkannte, daß man Mutationen erhalten konnte, die die Synthese lebenswichtiger Stoffwechselprodukte beeinflussten. *E. coli* wächst z.B. normalerweise gut auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. Als Ergebnis spezifischer Mutationen kennt man nun aber auch *E. coli*-Stämme, die nur wachsen, wenn man ihrem normalen Medium spezielle Stoffwechselprodukte (Wachstumsfaktoren) zusetzt. Dieser Mutationstyp war nur wenige Jahre vorher (1941) für die haploide niedere Pflanze *Neurospora* (einen Schimmelpilz) beschrieben worden. Es ist sehr leicht, mit diesen Mutationen zu arbeiten: um ihre Anwesenheit nachzuweisen, läßt man eine verdächtige Mutante sowohl in Anwesenheit wie in Abwesenheit eines Stoffwechselproduktes, z.B. der Aminosäure Arginin (Abbildung 7-5) wachsen. Wenn eine Mutation aufgetreten ist, die die Biosynthese von Arginin unmöglich macht, wird sich das Bakterium nur in Anwesenheit von Arginin vermehren. Die Anwendung dieser Methode führte zusammen mit der Verwendung von Mutagenen rasch zur Isolierung einer großen Zahl verschiedener Genmutationen, die jeweils die Synthese spezifischer Verbindungen beeinflussen.

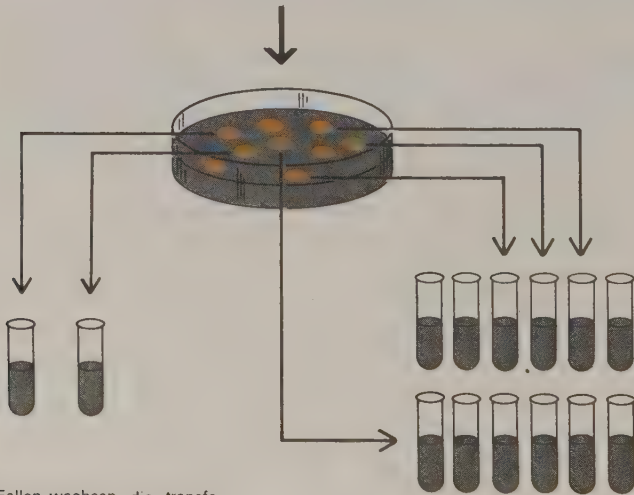
Ein weiterer wichtiger Mutationstyp betrifft die Resistenz von Bakterien gegen giftige Substanzen wie Antibiotika. So werden z.B. die meisten *E. coli*-Zellen durch kleine Mengen von Streptomycin rasch abgetötet. Sehr selten kommt es jedoch zu Mutationen, (Strep<sup>R</sup>), die die Zelle gegen gewisse

Mengen des Antibiotikums resistent machen. Es gibt auch Mutationen, die Zellen gegen Virusvermehrung resistent machen. Eine der brauchbarsten Mutationen des *E. coli*-Stammes B verleiht Resistenz gegen T1-Phagen; diese Mutantenzellen werden als B/1 bezeichnet. Entsprechend werden *E.*

Behandlung der *E. coli*-Zellen  
mit einem Mutagen - Nitrosoguanidin



Die behandelten Zellen werden auf eine Petrischale mit einem festen Agar aufgetragen, der reich an Nährstoffen, wie den 20 AS, den verschiedenen Purinen und Pyrimidinen, allen bekannten Vitaminen etc., ist. Viele der behandelten Zellen können sich nicht vermehren, da sie vom Mutagen abgetötet werden. Die überlebenden Zellen wachsen, teilen sich und bilden auf dem festen Agar einzelne Kolonien.



In wenigen Fällen wachsen die transferierten Zellen nicht mehr, da sie von Zellen mit einer Mutation abstammen, die die Biosynthese einer der Substanzen, die im Nähragar enthalten war, betrifft. Die Identität des Wachstumsfaktors kann man leicht feststellen, indem man die verschiedenen Verbindungen des Nähragars nach

und nach einzeln zugibt. Die meisten Zellen, die auf dem reichhaltigen Nährmedium wachsen, vermehren sich ebenso, wenn sie auf ein Minimalmedium, das nur Glucose und anorganische Salze enthält, übertragen werden.

ABBILDUNG 7-5 Die Isolierung von *E. coli*-Mutanten, die spezifische Wachstumsfaktoren benötigen.

*coli*-Zellen des Stammes B, die gegen T2 und T4-Phagen resistent sind, B/2, bzw. B/4 genannt. Noch andere Mutationen beeinflussen die Fähigkeit der Colizellen auf Zuckern wie Lactose, Galactose oder Maltose zu wachsen; eine spezifische Mutation kann zum Verlust der Fähigkeit führen, einen dieser Zucker als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden. Auf die Isolierung von Mutationen, die Wachstumsfaktoren erfordern oder Resistenz gegen Antibiotika und Phagen verleihen, folgten rasch Versuche, die das Auftreten von genetischen Rekombinationen (also eines geschlechtlichen Vorganges) bei *E. coli* aufzeigten (Abbildung 7-6). Von diesen Mutantengenen wurde in zweifacher Weise Gebrauch gemacht. Erstens verwendete man sie als konventionelle genetische Merkmale, aus deren Segregationsverhalten man auf die Anordnung der Gene auf den Chromosomen schließen konnte. Zweitens boten sie die Möglichkeit, genetische Rekombinationsvorgänge nachzuweisen, die zu jedem gegebenen Zeitpunkt nur in einem kleinen Teil der Population auftreten. Einfache morphologische Betrachtung der Bakterienzelle von *E. coli* hatte keine Anhaltspunkte dafür gegeben, daß Zellverschmelzung und genetische Rekombinationen auftraten. Um die Rekombination nachzuweisen, mußte man ein Experiment entwerfen, in dem sich nur die Rekombinantenzellen weiter vermehren konnten. Man verwendete dazu parentale Stämme, die bestimmte Wachstumsfaktoren benötigten und sich in einem Minimalmedium nicht vermehrten.

In diesen Versuchen wurden zwei Bakterienstämme mit jeweils spezifischen Wachstumserfordernissen zusammengemischt. Keiner der Stämme konnte sich in Abwesenheit eines bestimmten Stoffwechselproduktes oder Wachstumsfaktors vermehren (d.h. ein Stamm brauchte die Aminosäure Threonin und Leucin, der andere das Vitamin Biotin und die Aminosäure Methionin). Nachdem die Stämme gemischt worden waren, konnte ein kleiner Prozentsatz auch ohne Wachstumsfaktoren auskommen. Das bedeutet, daß sie auf irgendeine Weise gute Kopien jedes ihrer Mutantengene erhalten hatten. Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis darauf, daß *E. coli* eine sexuelle Phase besitzt, während derer die Chromosomen von zwei verschiedenen Zellen zusammenkommen. Crossing-over könnte dann dazu führen, daß ein Chromosom gute Kopien all seiner notwendigen Gene enthält. Diese Hypothese wurde durch weitere genetische Analysen bestätigt und während der letzten 10 Jahre wurde *E. coli* zu einem der genetisch am besten erfaßten Organismen.

## AUCH VIREN ENTHALTEN CHROMOSOMEN

Auch bei Viren wird die Vererbung durch Chromosomen kontrolliert. Diese Krankheitserreger, die viel kleiner als Bakterien sind, können in eine Zelle

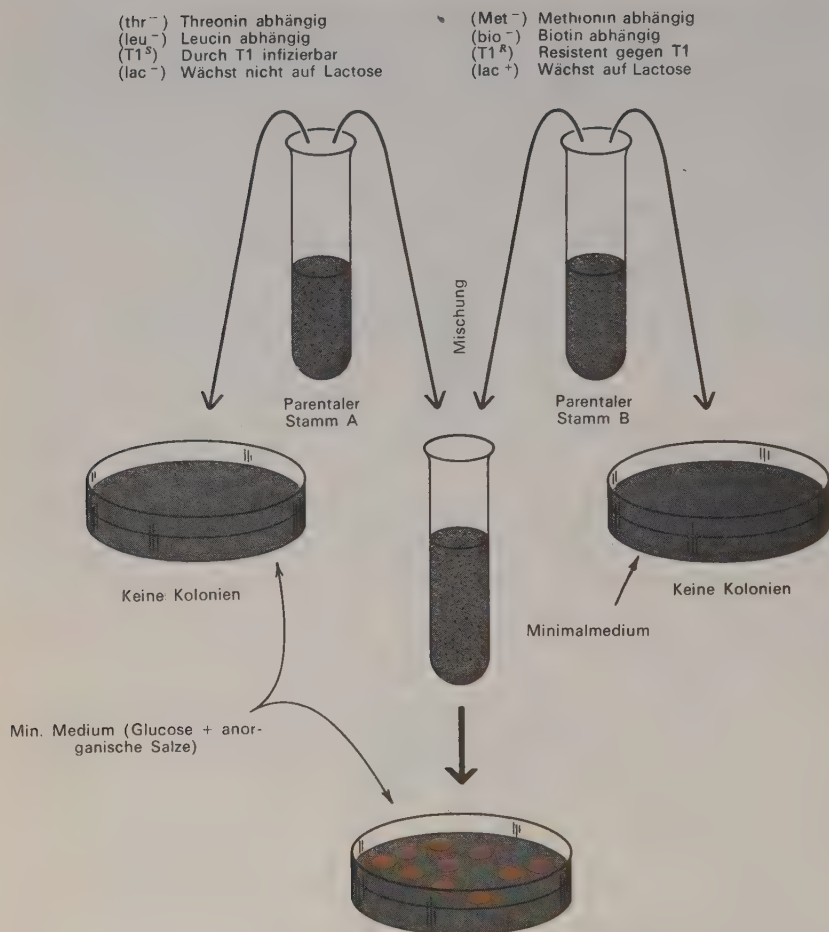


ABBILDUNG 7-6 Verwendung von Wachstumsfaktor-abhängigen Stämmen zum Nachweis der Sexualität bei *E. coli*.

eindringen (sie infizieren) und sich dort zu einer großen Zahl neuer Virus-  
 teilchen vermehren. Erkältungen, Influenza und Poliomyelitis sind nur einige  
 der vielen Krankheiten, die durch Viren hervorgerufen werden. Es besteht  
 ein sehr enges Verhältnis zwischen Viren und ihren Wirtszellen, da Viren  
 sich erst vermehren können, wenn sie in eine Zelle eingedrungen sind;  
 außerhalb sind sie völlig inert. Bei den meisten, oder vielleicht sogar allen,



Pflanzen und Tieren kennt man Viren. Sie können sich auch in Bakterien vermehren (man nennt diese Viren dann Bakteriophagen oder kurz Phagen). Die Replikation vieler neuer Viruspartikeln in einer einzigen Zelle führt im allgemeinen zum Zelltod - daher auch ihre krankheitserregende Wirkung.

Unsere Kenntnisse der Genetik einiger Bakteriophagen haben sich in den letzten Jahren gleich schnell und fast gleichzeitig wie die Kenntnis der Bakterien entwickelt. Vor 1940 dachte beinahe niemand über die Genetik von Viren nach. Die meisten Wissenschaftler fanden Viren viel zu klein, um sie zu untersuchen, falls sie nicht eine Krankheit hervorrufen konnten, die man unter Kontrolle bringen wollte. Man kann sie im Lichtmikroskop nicht sehen und sie konnten nur durch ihre Fähigkeit, Zellen zu töten, nachgewiesen werden. Diese Einstellung änderte sich jedoch aus mehreren Gründen. Erstens fand man, daß man mit Bakteriophagen sehr gut arbeiten konnte und daß das Phagen-Bakterien-System für die Untersuchung des allgemeineren Problems, wie sich Gene vermehren und funktionieren, ideal geeignet war. Zweitens fand man, daß Mutationen bei Phagen mit gleicher oder noch größerer Leichtigkeit erzielt werden können als bei Bakterien.

Chemisch gesehen sind Viren, sowohl bezüglich ihrer Größe als auch in der Vielfalt ihrer chemischen Bestandteile, äußerst heterogen (Abbildung 7-7). Viele Jahre hindurch war ihre biologische Bedeutung unklar und es wurde häufig die Frage gestellt «Leben Viren überhaupt?». Jetzt wissen wir, daß Viren kleine Stücke genetischen Materials darstellen, die jeweils von einer schützenden Proteinhülle umgeben sind und so von Zelle zu Zelle transportiert werden können. Die Virusnachkommenschaft gleicht den parental Viren, da sie die gleichen Chromosomen enthalten. Wir sehen auch, daß Viren sozusagen kein höheres Maß an selbständigem Leben haben als isolierte Chromosomen; sowohl die Chromosomen einer Zelle als die von Viren können sich nur in der komplexen Umgebung einer lebenden Zelle vermehren. Die Untersuchungen an Viren waren von ungeheuerem Wert für das Verständnis der Lebensvorgänge in einer Zelle: Viren eignen sich einmalig gut für Untersuchungen der Frage, welche Folgen die plötzliche Einführung von zusätzlichem genetischen Material auf eine Zelle hat.

## VIREN VERMEHREN SICH NICHT DURCH ALLMÄHLICHES GRÖSSENWACHSTUM

Der Lebenszyklus einer durchschnittlichen Zelle umfaßt ein schrittweises Anwachsen auf die doppelte Größe, dem die Zellteilung (Mitose) und die Bildung zweier identischer Tochterzellen folgt. Viren vermehren sich jedoch auf andere Weise. Sie entstehen nicht durch Teilung einer großen bereits vorhandenen Partikel - alle Virusteilchen einer bestimmten Art haben unge-

führt die gleiche (manchmal identische) Masse. Während der Virusvermehrung verschwinden für einige Zeit, der *Eklipse*, die ursprünglichen parentalen Viruspartikeln, da sie nach der Infektion zerfallen und ihr Chromosom von der schützenden äußeren Hülle befreit wird. Das freie Chromosom dient anschließend als Matrize für die Synthese neuer Virusbestandteile. Dieser Zerfallproze  ist für die Virusvermehrung unbedingt notwendig, da das Chromosom, solange es von der Proteinhülle vollständig eingeschlossen wird, nicht als Matrize für die Synthese neuer Chromosomen oder neuer Hüllproteine dienen kann.

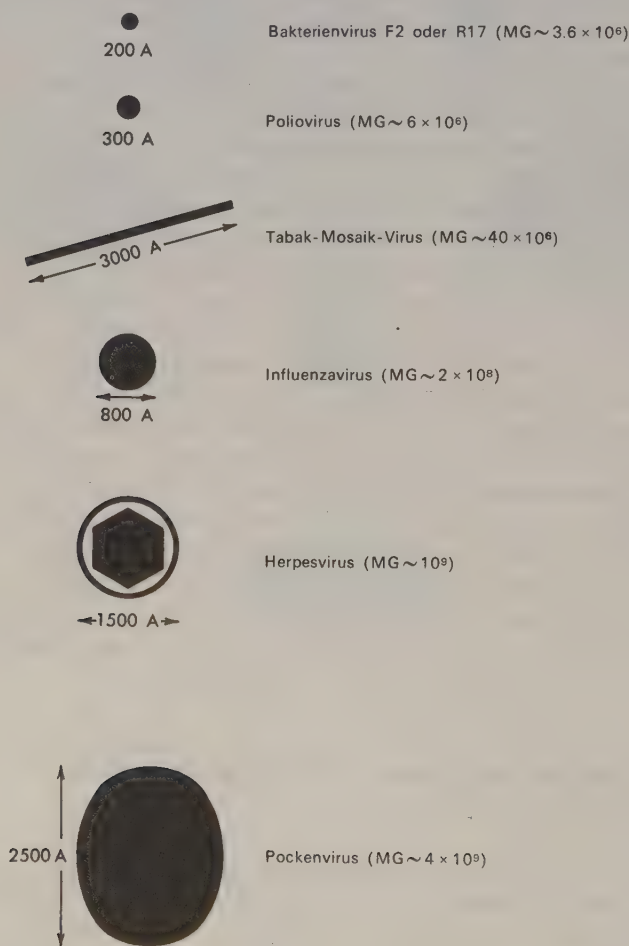


ABBILDUNG 7-7 Variationen in Größe und Form verschiedener Viren.

## VIREN SIND GENETISCHE PARASITEN

In den meisten Fällen sind die viralen Chromosomen, die immer aus Nukleinsäuren bestehen, und die Virusproteine aus den gleichen vier Nukleotiden und zwanzig Aminosäuren aufgebaut, die auch eine normale Zelle verwendet. Alle diese Vorstufen werden im allgemeinen von Enzymen der Wirtszelle synthetisiert. Auch die Energie, die für den Ablauf der biosynthetischen Vorgänge notwendig ist, stammt aus ATP, das von Wirtszellenzymen aus Nährstoffmolekülen produziert wird.

Viren sind daher obligatorische Parasiten. Außerhalb einer Zelle kann man sich keine Virusvermehrung vorstellen, da sie sowohl bezüglich der notwendigen Vorstufen als auch der Ribosomen, an denen die Proteinsynthese abläuft, auf die Zelle angewiesen sind. Das entscheidende Kriterium für Viren ist also nicht so sehr ihre beschränkte Größe, sondern die Tatsache, daß sie alleine nicht in der Lage sind, Proteine zu synthetisieren. Um sich vermehren zu können müssen sie ihre Nukleinsäure in eine funktionsfähige Zelle einbringen. Auf dieser Tatsache beruht die Unterscheidung zwischen größeren Viren, wie z.B. Pocken, und kleinen zellulären Organismen, wie den Rickettsien. Auch die Rickettsien sind obligatorische Parasiten, aber sie enthalten DNA und RNA und wachsen, indem sie an Größe zunehmen und sich in zwei kleinere Zellen spalten. Ihre Zellmembran bleibt immer erhalten und alle Proteine, die sie benötigen, werden auf ihrer eigenen Proteinsynthetisierenden Apparatur hergestellt.

## BAKTERIENVIREN (PHAGEN) SIND OFT LEICHT ZU UNTERSUCHEN

Wie schon vorher erwähnt, sind die Bakterienviren (Phagen) für einen Genetiker von ganz besonderem Interesse. Ihre Entdeckung im Jahr 1914 rief große Aufregungen hervor, da man hoffte, in ihnen ein einfaches und wirksames Mittel zur Bekämpfung bakterieller Erkrankungen gefunden zu haben. Leider waren die Phagen medizinisch aber unbrauchbar, da ihre bakteriellen Wirtsorganismen leicht mutieren, wobei sich auch virusresistente Mutanten bilden. Man verlor daher bald jedes Interesse an den Phagen und bis zum Ende der 30er Jahre beschäftigte sich kaum jemand mit ihrer Vermehrung. Dann begann eine kleine Gruppe von Biologen und Physikern, die sich für das Problem der Genreplikation interessierten, die Vermehrung mehrerer Phagen in *E. coli* zu untersuchen. Sie wählten Phagen statt pflanzlicher oder animaler Viren, weil sich Bakterien unter Laboratoriumsbedingungen so viel leichter als pflanzliche oder tierische Zellen züchten lassen.

Fast die gesamte Arbeit an Phagen konzentrierte sich auf einige wenige, die willkürlich Namen wie T1, T2, P1, F2 oder  $\lambda$  (Abbildung 7-8) erhielten.

Am besten bekannt sind die nahe verwandten Stämme T2, T4 und T6, und  $\lambda$ . Sie vermehren sich im wesentlichen alle nach dem gleichen Schema. Der Wachstumszyklus beginnt, wenn ein Phage auf ein sensitives Bakterium trifft und sich der Schwanz des Phagen spezifisch an die Bakterienzellwand anheftet. Ein Enzym im Schwanzteil des Phagen baut einen kleinen Teil der Zellwand ab, wodurch ein Loch entsteht, durch das das Viruschromosom in die Zelle eindringen kann. Das Viruschromosom verdoppelt sich, die Tochterchromosomen ebenfalls, wodurch nach und nach 100 bis 1000 neue Chromosomen gebildet werden, die mit neu synthetisierten Hüllproteinen umgeben werden und so eine große Zahl neuer Phagenpartikeln bilden.

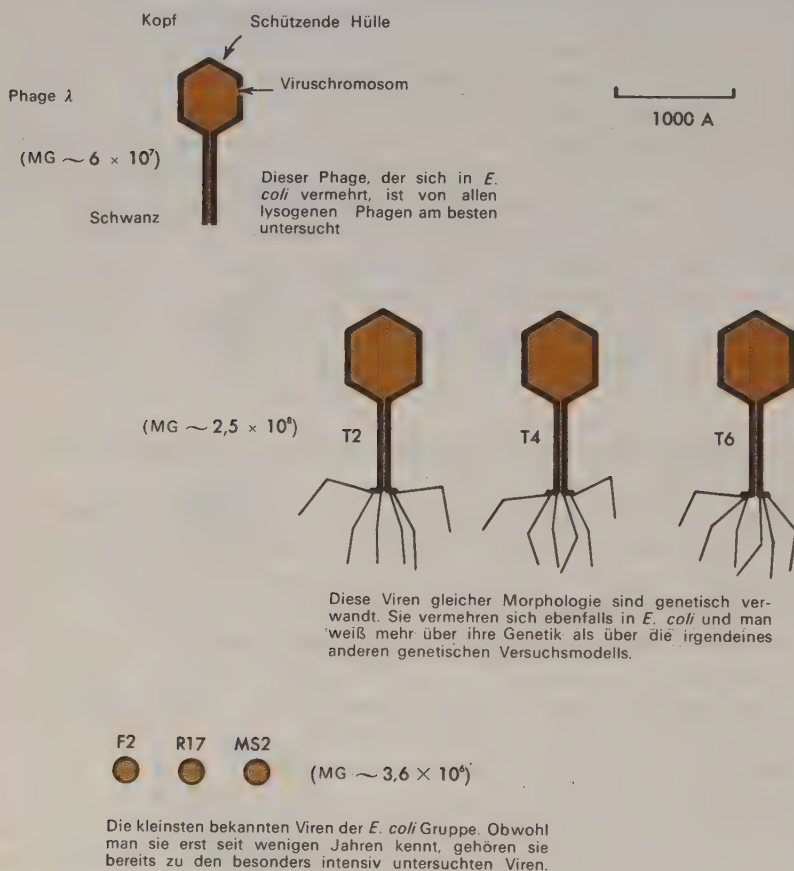


ABBILDUNG 7-8 Bakterielle Viren, die bei der Untersuchung der chemischen Genetik eine Rolle spielen.



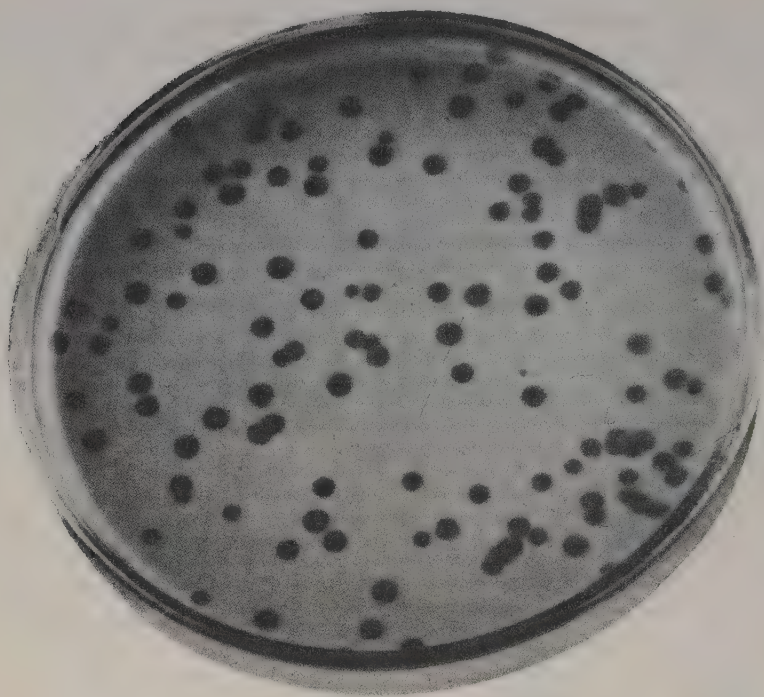
Der Wachstumszyklus ist beendet, wenn die bakterielle Zellwand aufgebrochen (lysiert) und die Phagennachkommenschaft an das umgebende Medium abgegeben wird.

### PHAGEN BILDEN PLAQUES

Die Anwesenheit lebensfähiger Phagenpartikeln kann rasch nachgewiesen werden, wenn man die virushaltige Lösung auf eine Nähragarplatte aufträgt, die Bakterien enthält, die gegenüber diesen Phagen empfindlich sind. Wenn keine Phagenpartikeln vorhanden sind, bilden die rasch wachsenden Bakterien auf der Oberfläche des Agars einen einheitlichen Bakterienrasen. Wenn aber auch nur ein einziger Phage in der Lösung ist, adsorbiert er an ein Bakterium und vermehrt sich unter Bildung hunderter neuer Virusteilchen, die nach Auflösung der Zellwand (Lyse) 15-60 Minuten nach Infektion plötzlich an die Umgebung abgegeben werden. Jeder einzelne der etlichen 100 Nachkommen kann sich an ein neues Bakterium anheften und sich vermehren. Nach mehreren solchen Zyklen von Adsorption, Vermehrung und Freisetzung, sind alle Zellen in unmittelbarer Nähe der ursprünglichen Viruspartikel getötet. Diese Zonen toter Bakterien erscheinen als runde Löcher (Plaques) im gesunden Bakterienrasen (Abbildung 7-9).

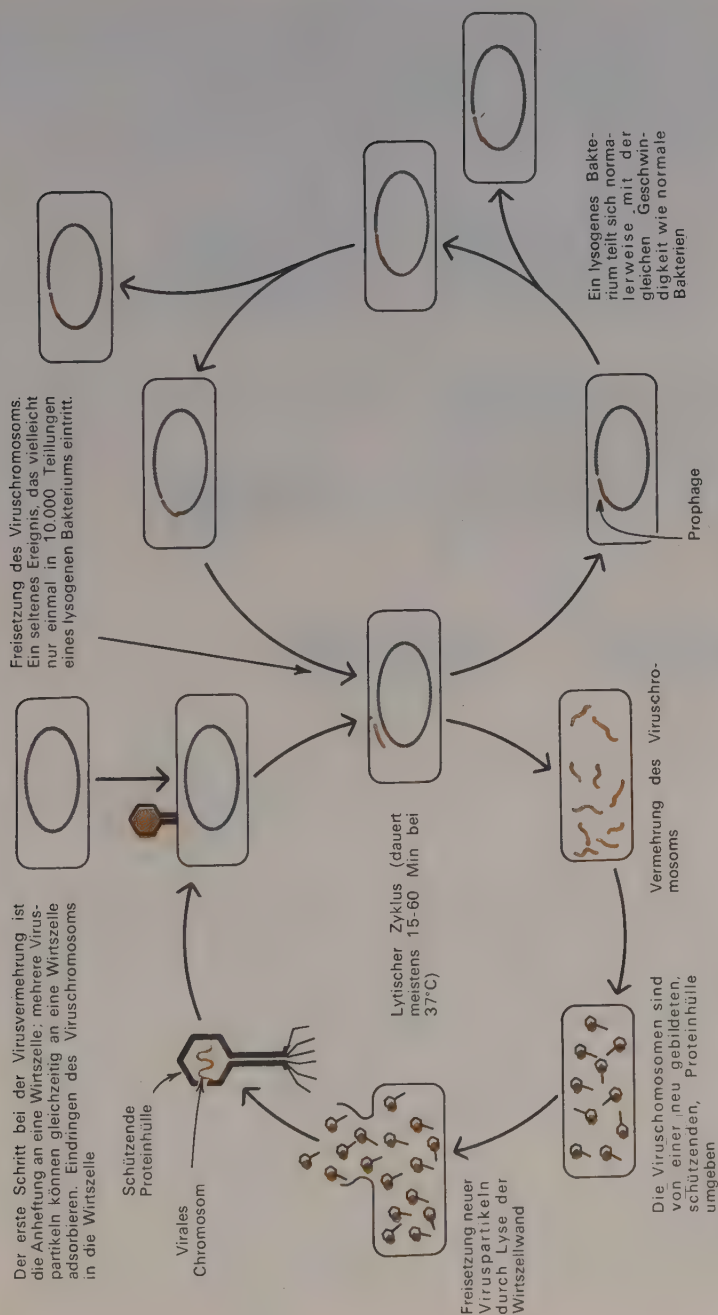
### VIRUSCHROMOSOMEN WERDEN MANCHMAL IN DIE CHROMOSOMEN DER WIRTSZELLE EINGEBAUT

Einige Bakterienviren (z.B. der  $\lambda$ -Phage) vermehren sich nicht immer, wenn sie in eine Zelle eindringen. Statt dessen wird ihr Chromosom manchmal in einen bestimmten Abschnitt des Wirtschromosoms eingebaut. Das virale Chromosom verhält sich dann praktisch wie ein Teil des Wirtschromosoms und wird so wie dieses nur einmal innerhalb jeder Zellgeneration repliziert. (Abbildung 7-10). Man nennt das Viruschromosom, das in ein Wirtszellchromosom integriert ist, den *Prophagen*; Bakterien, die Prophagen enthalten, heißen *lysogene Bakterien*; Viren, deren Chromosomen Prophagen werden können, bezeichnet man als *lysogene Viren*. Im Gegensatz dazu werden Viren (z.B. T2) die sich jedesmal, wenn sie in eine Wirtszelle eindringen, vermehren, *lytische Viren* genannt. Es ist oft sehr schwierig zu bestimmen, ob ein Bakterium lysogen ist. Erst wenn das Viruschromosom wieder aus dem Wirtszellchromosom entlassen wird und die Vermehrung von neuen viralen Nachkommen beginnt, kann man ganz sicher sein. Es ist noch eine völlig offene Frage, warum nur bestimmte Viren (lysogene Viren) eine lysogene Verbindung eingehen und welche Vorteile sie daraus ziehen. Bis vor



**ABBILDUNG 7-9** Aufnahme von T2-Phagen-Plaques in einem *E. coli*-Rasen, der in einer Petrischale gezüchtet wurde (Aus G.S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*, Freeman, San Francisco, 1963, S. 41, mit Genehmigung).

kurzem war es noch ganz unklar, auf welche Weise das Viruschromosom in einen Prophagen umgewandelt wird. Es gibt nun gute genetische Hinweise dafür, daß der Einbau des Viruschromosoms durch Crossing-over des Wirtszellchromosoms mit einer zirkulären Form des Viruschromosoms zustande kommt. Vor dem Einbau bildet das Viruschromosom einen Ring und lagert sich an eine spezifische Region des Wirtszellchromosoms an. Dann treten sowohl im Wirtszellchromosom als auch im Viruschromosom Brüche auf; die Enden des Viruschromosoms vereinigen sich mit den Enden des Bakterienchromosoms anstatt mit den eigenen, wodurch der Prophage in das Wirtszellchromosom eingefügt wird (Abbildung 7-11). Durch einen umgekehrten Vorgang wird der Prophage wieder aus dem Wirtszellchromosom entlassen: die beiden Enden des Prophagen paaren sich, worauf durch ein Crossing-over das Viruschromosom wieder ausgestoßen wird. Das freigesetzte virale Genom kann sich nun genauso vermehren, als ob es das Chromosom eines lytischen Virus wäre.



**ABBILDUNG 7-10** Lebenszyklus eines lysogenen Bakteriophagen. Wir sehen, daß das Viruschromosom sich manchmal sofort nach Eintritt in eine Zelle vermehrt, wie ein lytisches Virus, wogegen es in anderen Fällen zu einem Prophagen wird. Die lytische Phase seines Lebenszyklus ist identisch mit dem gesamten Lebenszyklus eines lytischen (nicht lysogenen) Virus. Lytische Bakteriophagen heißen deshalb so, weil ihre Vermehrung zum Aufbrechen (Lyse) der Zellwand führt.

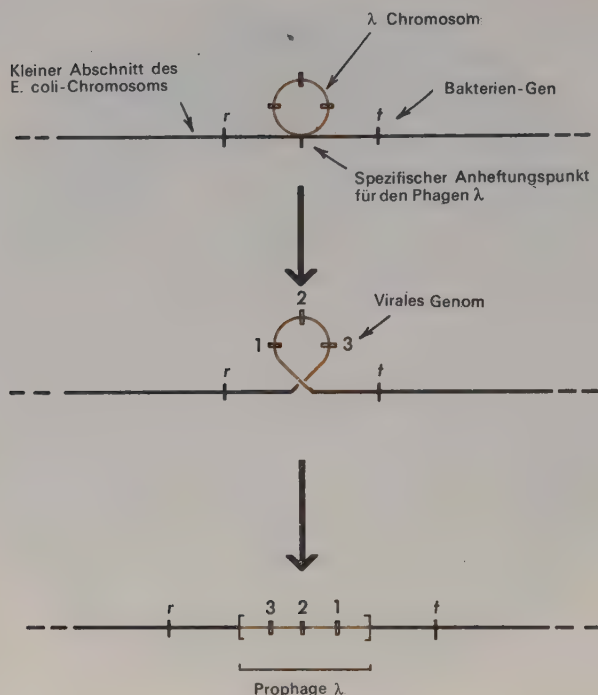


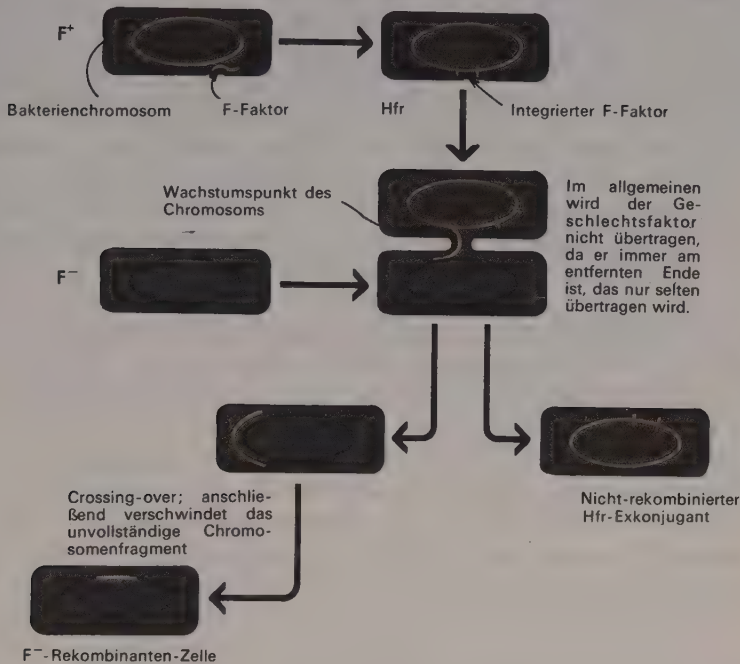
ABBILDUNG 7-11 Einfügung des Chromosoms des Phagen  $\lambda$  in das E. coli-Chromosom durch Crossing-over.

## KARTIERUNG VON BAKTERIENCHROMOSOMEN DURCH PAARUNG

Viele Organismen, die heute für Untersuchungen von Genen und ihrer Funktionsweise von unschätzbarem Wert sind, haben keine Meiose im eigentlichen Sinn. Als man zum ersten Mal die Sexualität von Bakterien feststellte, schien es am einfachsten, anzunehmen, daß der übliche Zyklus von Zellverschmelzung gefolgt von meiotischer Segregation abliefe. Wir wissen heute jedoch, daß der *E. coli*-Zyklus bestimmte Merkmale aufweist, die eine übliche genetische Analyse erschweren. Die Schwierigkeiten sind durch die Art des Paarungsvorganges bedingt. Wie bei höheren Organismen gibt es auch hier männliche und weibliche Zellen. Der Geschlechtszyklus beginnt, wenn sich männliche und weibliche Zellen über eine schmale Brücke verbinden (Abbildung 7-12). Das männliche Chromosom beginnt dann durch die Brücke in die weibliche Zelle zu wandern. Der Transfer ist im allgemeinen



unvollständig und es gelangt nur ein Teil des männlichen Chromosoms in die weibliche Zelle, bevor sich die gepaarten Zellen wieder trennen. Es kommt also nur selten zur Bildung einer vollständigen diploiden Zelle, meistens entstehen nur teilweise diploide Zellen. Anschließend findet ein



**ABBILDUNG 7-12** Sexualität bei *E. coli* Die Chromosomenübertragung von der männlichen auf die weibliche Zelle stellt eine primitive Form des Geschlechtsvorganges bei *E. coli* dar. Wenn der F-Faktor mit dem männlichen Chromosom verbunden ist, ist die männliche Zelle - nun eine Hfr-Zelle - in der Lage, ihr Chromosom auf die weibliche Zelle zu übertragen. Wenn Hfr- und  $F^-$ -Zellen miteinander durch eine schmale Brücke verbunden sind, bricht das Hfr-Chromosom an der Stelle, an der der F-Faktor eingebaut wurde und beginnt sich zu verdoppeln. Ein freies Ende eines der Hfr-Tochterchromosomen beginnt dann, sich in die  $F^-$ -Zelle zu schieben. Bei  $37^\circ\text{C}$  dauert die Übertragung eines vollständigen Chromosoms etwa 90 Minuten. Im allgemeinen gelangt jedoch nur ein Teil des Hfr-Chromosoms in die  $F^-$ -Zelle bevor die beiden Zellen sich wieder trennen; anschließend findet Crossing-over zwischen dem genetischen Material des Donators und dem  $F^-$ -Chromosom statt. Eliminierung der überzähligen Gene, die nicht in ein ganzes Chromosom eingebaut wurden, stellt den haploiden Zustand wieder her. Die Rekombinanten-Zellen werden dann auf das Vorhandensein verschiedener Hfr- und  $F^-$ -Gene untersucht. Auf diese Weise kann man Genkarten herstellen.

Crossing-over zwischen dem weiblichen und männlichen Chromosom (oder Chromosomenbruchstück) statt, auf welches die Segregation zu haploiden Tochterzellen folgt.

Der Geschlechtsunterschied zwischen männlichen und weiblichen Zellen wird durch die Anwesenheit eines spezifischen genetischen Faktors bestimmt, dem sogenannten F (ertility = Fertilitäts-) Faktor. Ist er anwesend ( $F^+$ ), so sind die Zellen männlich; fehlt er, sind sie weiblich ( $F^-$ ). Der F-Faktor kommt in zwei Zustandsformen vor, entweder als Teil des *E. coli*-Chromosoms, oder als sehr kleines, freies Chromosom, das sich einmal bei jeder Zellteilung verdoppelt. Im letzteren Fall sind die  $F^+$ -Zellen nur potentiell männlich, denn sie können ihr Chromosom nicht ohne weiteres auf  $F^-$ -Zellen übertragen. Nur wenn der F-Faktor ein Teil des männlichen Chromosoms ist, können die männlichen Zellen sich mit weiblichen Zellen paaren.  $F^+$ -Zellen mit integrierten Geschlechtsfaktoren werden als Hfr (high frequency of recombination = hohe Frequenz der Rekombination) bezeichnet.

Es gibt eine Reihe verschiedener Hfr-Stämme, bei denen der F-Faktor an verschiedenen Stellen des Chromosoms eingebaut ist. Bis vor kurzem hatte man keine gute Hypothese, wie der F-Faktor ein Teil des Bakterienchromosoms wird. Es gibt jetzt recht gute Hinweise, daß der F-Faktor, wie das Chromosom lysogener Phagen, ringförmig ist und durch Crossing-over in das Chromosom eingebaut wird.

Sowohl der F-Faktor als auch die Phagen lysogener Chromosomen werden Episomen genannt. Ein Episom ist definiert als eine genetische Partikel, die entweder frei oder als Teil eines Chromosoms existieren kann. Bis heute wurden Episomen nur bei Bakterien nachgewiesen; es gibt jedoch Hinweise, daß sie auch in höheren Pflanzen und Tieren vorkommen.

Die genetische Analyse wurde anfänglich dadurch erschwert, daß nur ein Teil des männlichen Chromosoms in die weibliche Zelle gelangt. Dann fand man jedoch, daß immer ein ganz bestimmtes Ende des männlichen Chromosoms, das für jeden Hfr-Stamm spezifisch ist, zuerst in die weibliche Zelle eintritt. Die relative Häufigkeit, mit der männliche Gene in das Rekombinantenchromosom eingebaut werden, ist also ein Maß dafür, wie dicht sie bei diesem zuerst eintretenden Ende liegen. Man kann außerdem künstlich durch heftiges Schütteln die männlichen und weiblichen Zellen trennen (ursprünglich verwendete man dazu einen Mixer, den Waring Blendor); Paarung kann stattfinden und die Paare zu festgesetzten Zeiten während des Vorgangs heftig geschüttelt werden (die sogenannten Blendor Experimente). Wenn die Paare kurz nach Vereinigung wieder getrennt werden, sind nur die Gene, die nahe dem vorderen Ende liegen, in die weibliche Zelle gelangt. Man kann daher die Positionen von *E. coli*-Genen einfach dadurch bestimmen, daß man die Zeitspannen beobachtet, zu denen verschiedene männliche Allele in der weiblichen Zelle angelangt sind.

## BAKTERIENCHROMOSOMEN SIND RINGFÖRMIG

Die Genkarte, die man durch Analyse unterbrochener Paarungen erhält, gleicht der, die auf der Analyse von Rekombinationshäufigkeiten beruht. Wie bei der Genkarte höherer Organismen sind auch die Gene von Bakterien in einer unverzweigten Geraden angeordnet. Es gibt aber einen wichtigen Unterschied:

**TABELLE 7-1.** Aufschlüsselung der Gene des *E. coli*-Chromosoms<sup>a</sup>

Genetische Symbole	Eigenschaft der Mutante	Betroffene Enzyme oder Reaktionen
araD araA araB araC	Können Arabinose nicht als Kohlenstoffquelle verwenden	L-Ribulose-5-phosphat-4-Epimerase L-Arabinose-Isomerase L-Ribulokinase
argB argC argH argG argA argD argE argF		N-Acetylglutamat-Synthetase N-Acetyl- $\gamma$ -glutamat-Kinase N-Acetylglutaminsäure- $\gamma$ -semialdehyd-Dehydrogenase Acetylornithin-d-Transaminase Acetylornithinase Ornithin-Transcarbamylase Argininobernsteinsäure-Synthetase Argininosuccinase
aroA, B, C aroD	Benötigen mehrere aromatische Aminosäuren und Vitamine für das Wachstum	Shikimisäure zu 3-Enol-pyruvyl-shikimat-5-phosphat Biosynthese der Shikimisäure
azi bio		Resistent gegen Natriumazid; benötigt das Vitamin Biotin für das Wachstum
cysA cysB cysC	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Cystein	3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat zu-sulfid Sulfat zu Sulfid; 4 bekannte Enzyme
dapA dapB		Dihydrodipicolinsäure-Synthetase N-Succinyl-diaminopimelinsäure-Desacylase
dap + hom	Benötigt zum Wachstum die Aminosäurevorstufe Homoserin und die Zellwandkomponente Diaminopimelinsäure	Asparaginsäure-semialdehyd-Dehydrogenase

<sup>a</sup> Jedes bekannte Gen oder jeder Genverband wird mit dem zugehörigen Symbol und den Eigenschaften, die durch die Mutation hervorgerufen wird, angeführt. Wenn bekannt, ist auch das betroffene Enzym oder die Reaktion, die beeinträchtigt, angegeben.

TABELLE 7-1. (Fortsetzung)

<i>Gentische Symbole</i>	<i>Eigenschaft der Mutante</i>	<i>Betroffene Enzyme oder Reaktionen</i>
Dsd	Kann die Aminosäure D-Serin nicht als Stickstoffquelle heranziehen	D-Serin-Desaminase
fla	Geißeln fehlen	
galA	} Kann den Zucker Galactose nicht als Kohlenstoffquelle benützen	Galactokinase
galB		Galactose-1-phosphat uridyl-Transferase
galD		Uridin-diphosphogalactose-4-Epimerase
gua	Benötigt zum Wachstum das Purin Guanin	
H	Trägt das H-Antigen	
his	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Histidin	10 bekannte Enzyme <sup>b</sup>
ile	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Isoleucin	Threonin-Desaminase
ilvA	} Benötigt zum Wachstum die Aminosäuren Isoleucin und Valin	$\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -ketosäure
ilvB		Rectoisomerase
ilvC		$\alpha,\beta$ -Dihydroxyisovaleriansäure-Dehydrase <sup>b</sup> Transaminase B
ind (Indol)	Kann nicht auf Tryptophan als Kohlenstoffquelle wachsen	Tryptophanase
$\lambda$	Stelle auf dem Chromosom, an der der Prophage $\lambda$ normalerweise integriert wird	
lacY	Kann $\beta$ -Galactoside nicht konzentrieren	Galactosid-Permease
lacZ	Kann den Zucker Lactose nicht als Kohlenstoffquelle verwenden	$\beta$ -Galactosidase
lacO	Konstitutive Synthese der Proteine des Lactose-Operons (siehe Kapitel 14)	Defektes Operatorgen
leu	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Leucin	

<sup>b</sup> Enzyme, die durch homologe Gen-Loci in *Salmonella typhimurium* kontrolliert werden.



TABELLE 7-1. (Fortsetzung)

Genetische Symbole	Eigenschaft der Mutante	Betroffene Enzyme oder Reaktionen
lon (lange Form, «long»)	Filamentbildung und Strahlensensitivität sind beeinflußt	
lys	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Lysin	Diaminopimelinsäure-Decarboxylase
lys + met	Benötigt zum Wachstum die Aminosäuren Lysin und Methionin	
$\lambda$ rec, malA	Resistent gegen den Phagen $\lambda$ , kann den Zucker Maltose nicht verwerten	$\lambda$ -Phagenrezeptor und Maltose-Permease
malB	Kann den Zucker Maltose nicht als Kohlenstoffquelle verwenden	Amylomaltase (?)
metA metB	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Methionin Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Methionin oder Cobalamin	Synthese des Bernsteinsäureesters von Homoserin Bernsteinsäureester von Homoserin + Cystein zu Cystathionin 5,10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase
metF metE		
mtl	Kann nicht den Zucker Mannit als Kohlenstoffquelle verwenden	Mannit-Dehydrogenase (?)
muc	Bildet mucoide Kolonien	Regulation der Synthese von Kapsel-Polysacchariden
O	Trägt das O-Antigen	
pan	Benötigt das Vitamin Pantothersäure für das Wachstum	
phe A, B	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Phenylalanin	
pho	Kann keine Phosphatester verwerten	Alkalische Phosphatase
pil	Trägt Filamente (Pili) auf der Zellwand	
proA proB proC	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Prolin Benötigt zum Wachstum bestimmt Purine	Adenylosuccinat-Synthetase Adenylosuccinase 5-Aminoimidazol-ribotid (AIR) zu 5-Aminoimidazol-4-(N-succinocarboximid)-ribotid, Biosynthese von AIR
purA purB purC, E		
purD		

TABELLE 7-1. (Fortsetzung)

<i>Genetische Symbole</i>	<i>Eigenschaft der Mutante</i>	<i>Betroffene Enzyme oder Reaktionen</i>
pyrA	Benötigt zum Wachstum das Pyrimidin Uracil und die Aminosäure Arginin	Carbamatkinase
pyrB pyrC pyrD pyrE pyrF	Benötigt zum Wachstum das Pyrimidin Uracil	Aspartat-Transcarbamylase Dihydroorotase Dihydroorotsäure-Dehydrogenase Orotidylsäure-Pyrophosphorylase Orotidylsäure-Decarboxylase
R arg	Konstitutive Synthese von Arginin (siehe Kapitel 14)	Repressor für Enzyme, die an der Synthese von Arginin beteiligt sind
R gal	Konstitutive Synthese von Galactose	Repressor für Enzyme, die an der Synthese von Galactose beteiligt sind
R1 pho, R2 pho	Konstitutive Synthese von Phosphatase	Repressor der alkalischen Phosphatase
R try	Konstitutive Synthese von Tryptophan	Repressor für Enzyme die an der Tryptophansynthese beteiligt sind
Rc (RNA-Kontrolle)	Unkontrollierte Synthese von RNA	
rha	Kann den Zucker Rhamnose nicht verwerten	
serA serB	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Serin	3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Phosphoserin-Phosphatase
str	Resistent gegen oder abhängig von Streptomycin	
suc	Benötigt Bernsteinsäure	
T1, T5 rec	Resistent gegen die Phagen T1 und T5 (Mutanten heißen B/1,5)	Keine Rezeptoren für T1, T5
T1 rec	Resistent gegen den Phagen T1 (Mutante heißt B/1)	Kein Rezeptor für T1
T6, colK rec	Resistent gegen den Phagen T6 und Colicin K	Keine Rezeptoren für T6 und Colicin
T4 rec	Resistent gegen den Phagen T4 (Mutante heißt B/4)	Kein Rezeptor für T4

TABELLE 7-1. (Fortsetzung)

Genetische Symbole	Eigenschaft der Mutante	Betroffene Enzyme oder Reaktionen
thi	Benötigt zum Wachstum das Vitamin Thiamin	
thr	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Threonin	
thy	Benötigt zum Wachstum das Pyrimidin Thymin	Thymidylat-Synthetase
trpA	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Tryptophan	Tryptophan-Synthetase, A Protein
trpB		Tryptophan-Synthetase, B Protein
trpC		Indol-3-glycerinphosphat-Synthetase
trpD		Phosphoribosyl-anthranilat-Transferase
trpE		Anthranilat-Synthetase
tyr	Benötigt zum Wachstum die Aminosäure Tyrosin	
uvrA	Resistent gegen ultraviolette Strahlen	UV-induzierte Schäden in der DNA werden reaktiviert
xyl	Können den Zucker Xylose nicht als Kohlenstoffquelle verwerten	

Die Genkarte von *E. coli* (Abbildung 7-13) ist zirkulär: das männliche Chromosom muß an einer bestimmten Stelle aufgebrochen werden, bevor ein freies Ende in die weibliche Zelle eintreten kann. Wenn der Bruch nicht immer an der gleichen Stelle eintreten würde, könnten wir nicht beobachten, daß in bestimmten Bakterienstämmen einige Gene bevorzugt vor anderen übertragen werden. Die Bruchstelle ist jedoch nicht in allen Stämmen die gleiche. Der Grund dafür liegt darin, daß die Bruchstelle immer dort auftritt, wo der F-Faktor eingebaut wurde. Es gibt z.B. einen Hfr-Stamm, bei dem einige der Gene, die mit der Synthese von Threonin und Leucin verbunden sind, bald nach der Paarung übertragen werden, wogegen bei einem anderen Stamm ein Gen, das an der Methionin Synthese beteiligt ist, zuerst in die weibliche Zelle gelangt. Die Existenz vieler Stämme mit verschiedenen Bruchstellen war für die Genkartierung von größter Bedeutung. Würden alle Chromosomen immer mit demselben Ende zuerst eintreten, könnte man die Reihenfolge der Gene, die zuletzt in die Zelle gelangen, kaum auch nur annähernd bestimmen, da sie nur selten überhaupt in die weibliche Zelle eintreten.





Wir wissen noch immer nicht, welche Kraft das männliche Chromosom in die weibliche Zelle treibt. Es gibt Hinweise dafür, daß der Vorgang mit der Chromosomenverdoppelung zusammenhängt; das heißt, das männliche Chromosom bricht nicht nur einfach auf und ein Ende beginnt die Übertragung in die weibliche Zelle. Es scheint statt dessen, daß der Bruch einen Zyklus der Chromosomenreplikation einleitet und daß während der Teilung des Hfr-Chromosoms in zwei Tochterchromosomen eines der beiden Tochterchromosomen in die weibliche Zelle eintritt. Die Chromosomenübertragung geht daher möglicherweise mit der Neusynthese eines Chromosoms oder Chromosomenabschnittes einher.

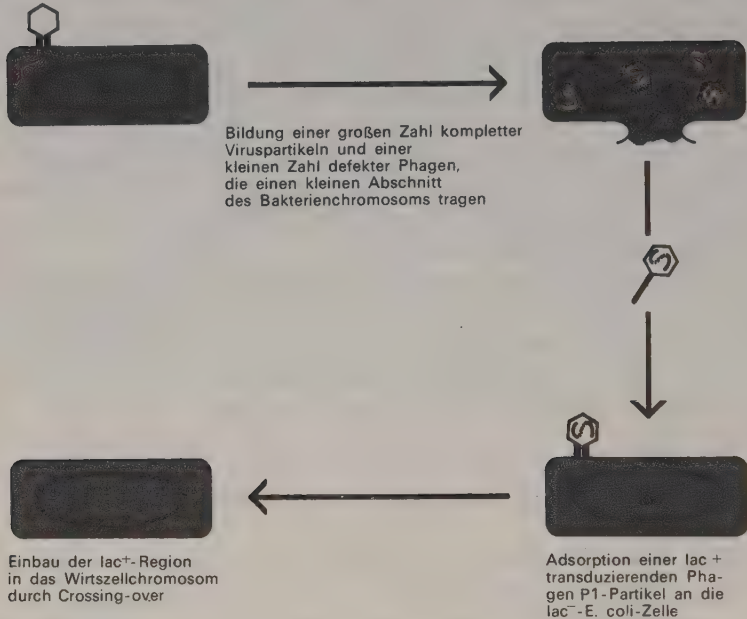
Die biologische Bedeutung ringförmiger Genkarten ist noch recht unklar. Es gibt auch bei Viruschromosomen zirkuläre Genkarten, deshalb sollte man diese Form bei *E. coli* nicht als eine merkwürdige Ausnahme betrachten. Wir werden auf die Diskussion solcher Ringe zurückkommen, wenn wir uns die genaue Chemie der Chromosomen ansehen.

## PHAGEN TRAGEN MANCHMAL BAKTERIELLE GENE

Bakterielle Gene können nicht nur während der Paarung übertragen werden, sie können auch durch Phagenteilchen passiv von einem Bakterium in ein anderes gelangen (Transduktion). Dazu kommt es, wenn eine Viruspartikel gebildet wird, die zufällig einen sehr kleinen Teil (im allgemeinen weniger als 1 oder 2 Prozent) ihres Wirtschromosoms enthält (*transduzierender Phage*). Wenn ein solches Virus, das meistens biologisch inaktiv ist, da das Viruschromosom unvollständig ist oder ganz fehlt, an eine Wirtszelle adsorbiert, wird der Abschnitt des Bakterienchromosoms in die Zelle injiziert. Dort kann es dann zum Crossing-over mit dem Wirtschromosom kommen. Wenn der transduzierende Phage auf einem Bakterienstamm vermehrt wurde, der sich von dem nachträglich infizierten Stamm genetisch unterscheidet, kann eine genetische Veränderung des Bakteriums eintreten. Z.B. enthält eine Suspension von Phagen P1, die auf einem *E. coli* Stamm gezüchtet wurden, der Lactose verwerten kann, einige Phagen, die das Gen ( $lac^+$ ) tragen, das am Lactosemetabolismus beteiligt ist. Wenn diese Phagen nun einen *E. coli* Stamm, der Lactose nicht verwerten kann, ( $lac^-$ ), infizieren, wird aufgrund der genetischen Rekombination, ein Teil der  $lac^-$  Bakterien in  $lac^+$  Bakterien umgewandelt.

Die Transduktion kommt sehr selten vor und man könnte daher annehmen, daß sie für die Aufklärung der Chromosomenstruktur nicht sehr gut geeignet ist. Tatsächlich war sie jedoch sehr wichtig für die Aussage, ob zwei Gene nahe beieinander liegen und in welcher Reihenfolge sie angeordnet sind. Die Zahl der bakteriellen Gene, die ein transduzierender Phage

Infektion von *E. coli*  
durch den Phagen P1



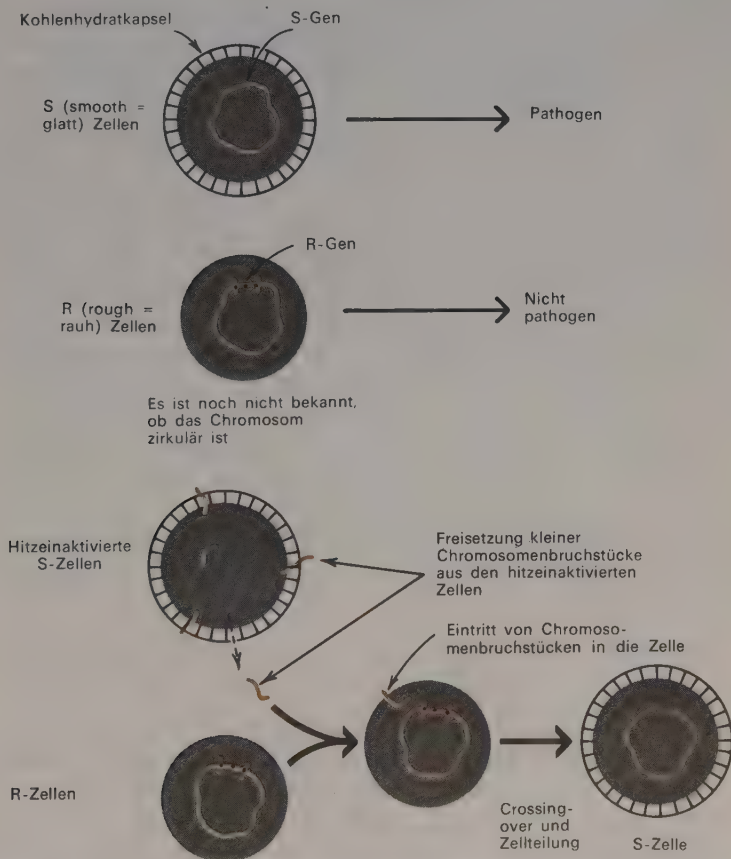
**ABBILDUNG 7-14** *Passive Übertragung von genetischem Material von einem Bakterium auf ein anderes, mit Hilfe eines Trägerphagen (Transduktion).*

mitnimmt, ist nämlich außerordentlich gering und es werden daher nur Gene, die sehr nahe beieinanderliegen im selben transduzierenden Phagen enthalten sein. Wenn man deshalb die Häufigkeit bestimmt, mit der Gruppen von Genen durch ein Phagenteilchen transduziert werden, kann man sehr genau die relative Anordnung der Gene zueinander bestimmen.

### ÜBERTRAGUNG GEREINIGTER CHROMOSOMENFRAGMENTE

Unter *Transformation* versteht man die genetische Rekombination, die nach Einführung gereinigter Chromosomen (DNA) abläuft. Mit Hilfe dieses entscheidenden biologischen Systems wurde DNA als genetisches Material chemisch identifiziert. Ursprünglich war die Transformation 1928 entdeckt worden, als man beobachtete, daß die Zugabe von hitzeinaktivierten Zellen eines pathogenen Stammes von *Diplococcus pneumoniae* zu einer Suspension von lebenden nicht pathogenen Pneumokokken dazu führte, daß ein kleiner Anteil der lebenden Zellen pathogen wurde. Die Vererblichkeit dieser Trans-

formation wurde bewiesen, indem man anschließend Abkömmlinge des neuen pathogenen Stammes für die weitere Transformation nicht pathogener Bakterien verwendete. Das ließ vermuten, daß bei der Hitzeinaktivierung des pathogenen Stammes seine Chromosomen (von denen man nun weiß, daß sie aus DNA bestehen) nicht beschädigt werden. Das Chromosomenmaterial, das aus den durch Hitze getöteten Zellen freigegeben wird, kann durch die Zellwand lebender Zellen eindringen und anschließend zu einer genetischen Rekombination mit dem Wirtszellchromosom führen (Abbildung 7-15).



**ABBILDUNG 7-15** Transformation der genetischen Merkmale einer Bakterienzelle (*Diplococcus pneumoniae*) durch Zugabe hitzeinaktivierter Zellen eines genetisch verschiedenen Stammes. Wir zeigen hier eine R-Zelle, in die ein Chromosomenfragment eindringt, das das S-Gen enthält. Die meisten R-Zellen erhalten jedoch andere Chromosomenfragmente und die Transformation ist für ein bestimmtes Gen daher ein seltener Vorgang. Die Transformationseffizienz für ein bestimmtes Gen ist meistens weniger als 1%.

Man konnte durch weitere Versuche die Richtigkeit der genetischen Interpretation des Transformationsvorganges bestätigen. Der pathogene Charakter wird durch ein Gen S (smooth = glatt) hervorgerufen, welches die chemischen Vorgänge in der Bakterienzellwand beeinflusst und zur Bildung einer Kohlenhydratkapsel führt. Wenn statt dessen das Allel R (rough = rau) dieses Gens vorliegt, wird keine Kapsel gebildet und die Zelle ist nicht pathogen.

Obwohl die ersten Transformationsversuche nur den chemischen Aufbau der Kapsel beeinflussten, weiß man nun, daß alle Gene durch Zugabe von extrahierten Chromosomen transformiert werden können. Da nur kleine Chromosomenfragmente auf diese Weise übertragen werden, kann man mit diesem Prozeß ebenfalls feststellen, welche Gene nahe beieinander liegen. Wegen der geringen Transformationswirksamkeit der meisten Bakterien bleibt die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode für genetische Probleme immer noch sehr beschränkt. Die Transduktion ist daher der Transformation als Methode zur Bestimmung der Reihenfolge der Gene in *E. coli* bei weitem überlegen. Die Transformation hat aber wertvolle Ergebnisse über die Anordnung der Gene in *Bacillus subtilis* geliefert, da für diesen Stamm kein brauchbarer transduzierender Phage bekannt ist.

Seit die Transformation zum ersten Mal gezeigt wurde, wurde viel darüber gerätselt, ob sie auch bei Organismen möglich ist, die größer als Bakterien sind. Man hat vor allem der Möglichkeit der Transformation bei Säugetieren, besonders dem Menschen, große Aufmerksamkeit gewidmet. Bis jetzt waren alle Resultate negativ, mit Ausnahme einiger Sonderfälle, bei denen Viren normale Zellen in Krebszellen umwandeln. Es kann aber sein, daß es sich dabei nicht um die Änderung eines bestehenden Gens, sondern um die Einführung von völlig neuem genetischen Material handelt. Auf alle Fälle sind vorderhand zu wenige gute Versuche durchgeführt worden, um sagen zu können, ob diese Methode der genetischen Analyse auf höhere Organismen ausgedehnt werden kann.

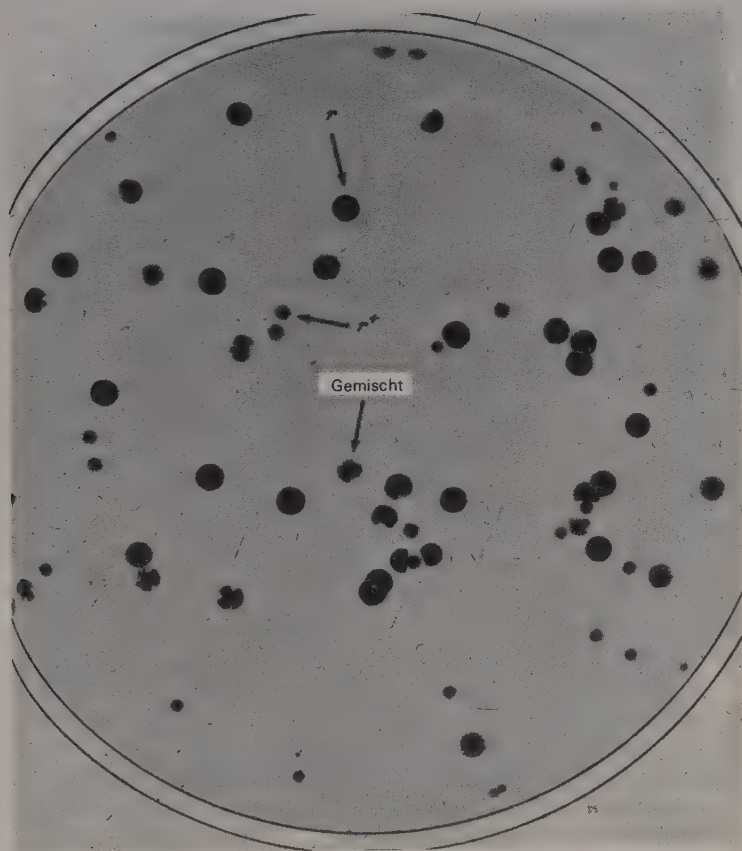
## AUCH PHAGEN KÖNNEN MUTIEREN

Die Plaques, die ein bestimmter Phagenstamm bildet, sind recht charakteristisch und können häufig leicht von denen genetisch verschiedener Phagen unterschieden werden. So kann man die Plaques des T2 Phagen leicht von denen des  $\lambda$ - oder des F2 Phagen unterscheiden. Noch bedeutender ist, daß Mutationen stattfinden können, die das Aussehen der Phagenplaques verändern. Im allgemeinen kennen wir die biochemischen Grundlagen dieser Unterschiede in den Plaques nicht, aber das spielt keine Rolle. Wichtig ist, daß die Unterschiede im allgemeinen reproduzierbar und leicht zu beobachten sind. Man kann die Morphologie tausender Plaques rasch betrachten, um zu sehen, ob



welche darunter sind, die sich von denen des Wildtyp-Phagen unterscheiden. Auf diese Weise wurden viele Mutationen, die den Plaquetyp betreffen, festgestellt (Abbildung 7-16).

Andere Arten von Mutationen verändern die Fähigkeit des Phagen, an Bakterien zu adsorbieren. Z.B. kann der Wildtyp Stamm von T2 sich auf dem *E. coli* Stamm B/2 nicht vermehren, da die B/2 Mutation die Zellober-



**ABBILDUNG 7-16** Aufnahme von Plaques einer Phagenmutation. Abgebildet sind die Plaques einer Mischung von T2r<sup>+</sup> (Wildtyp) und T2r (rasch lysierende Mutante). Die gemischten Plaques entstehen, wenn r und r<sup>+</sup> Phagen sich gleichzeitig im gleichen Plaque vermehren (Aus G. S. Stent, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*, Freeman, San Francisco, 1963, S. 177, mit Genehmigung).

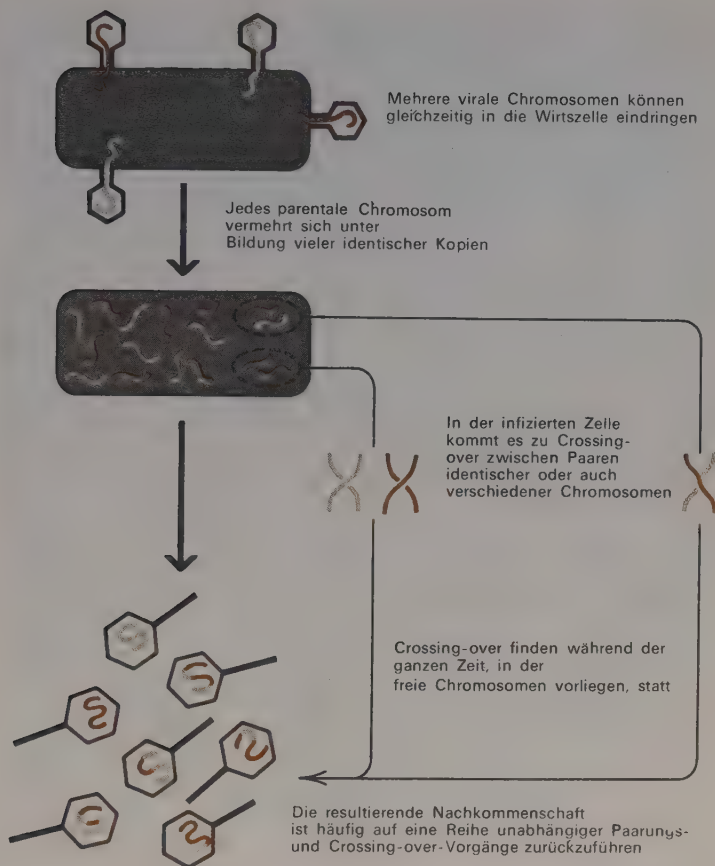
fläche verändert und so die Adsorption von T2 verhindert. T2 Mutanten können sich hingegen auf B/2 vermehren: man nennt sie T2h und sie können deshalb adsorbieren, weil sie veränderte Schwanzfasern haben.

Es gibt eine andere große und wichtige Klasse von Mutanten, die sich bei 25° C vermehren können, nicht aber bei 42° C (Temperatur-sensitive, bedingt letale Mutanten). Wir können zwar den genauen Grund noch nicht angeben, warum sich diese Mutanten bei höheren Temperaturen nicht vermehren, man nimmt aber an, daß bei diesen Temperaturen die 3-D-Struktur eines Proteins zerstört wird, das für die Phagenvermehrung notwendig ist. Diese Art von Mutationen war insofern sehr brauchbar, als viele virale Gene zu einer Temperatur-sensitiven Form mutieren können. Wenn man eine Mutante isoliert, die sich bei höheren Temperaturen nicht vermehrt, kann die Mutation in vielen verschiedenen Genen lokalisiert sein.

Das Vorhandensein bedingt letaler Mutationen ermöglichte es den Phagen-genetikern, Mutationen in praktisch allen Genen der Phagen T4 und  $\lambda$  zu finden. Obwohl die genetische Rekombination zwischen Virus-Mutanten erst 1945 entdeckt wurde, ist der T4-Phage heute das am besten und am vollständigsten charakterisierte genetische System.

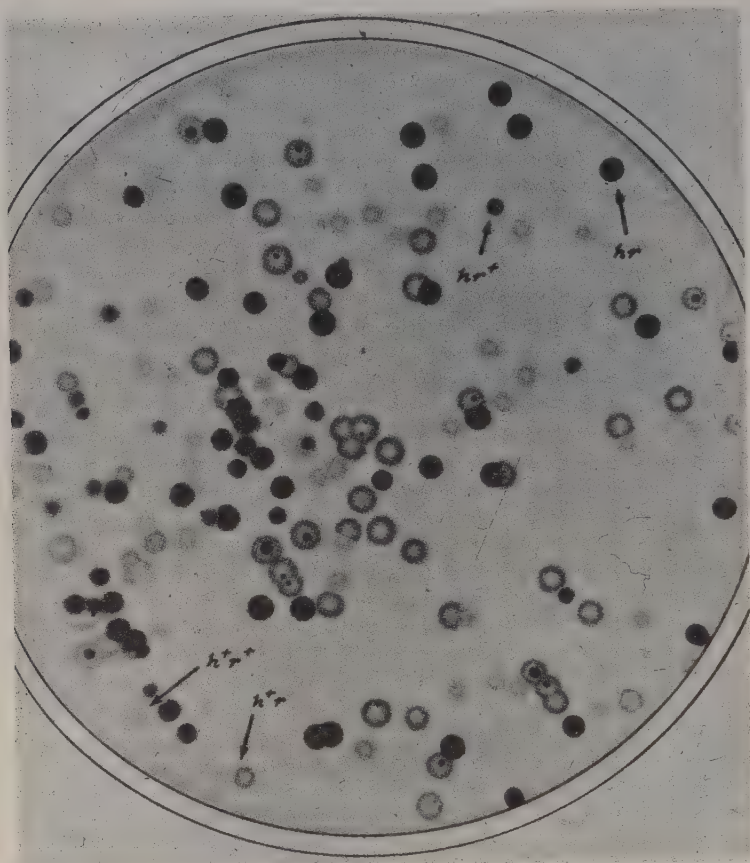
## PHAGENKREUZUNGEN

In einer einzigen Bakterienzelle kann sich zur gleichen Zeit mehr als eine Phagenpartikel vermehren. Wenn mehrere Partikeln gleichzeitig adsorbieren, dringen ihre Chromosomen in die Zelle ein, vermehren sich und bilden eine große Anzahl neuer Kopien. Solange die Chromosomen frei sind (nicht von einer schützenden Proteinhülle umgeben), kann Crossing-over mit anderen Chromosomen erfolgen (Abbildung 7-17). Das zeigt sich, wenn man Zellen mit zwei oder mehreren genetisch unterschiedlichen Phagenpartikeln infiziert und unter den Phagennachkommen genetische Rekombinanten findet. Man kann z.B. leicht T4 Mutanten erhalten, die sich vom Wildtyp durch zwei Mutationen unterscheiden, eine in einem h Gen, das die Vermehrung auf einem *E. coli* B/4 ermöglicht, einem Stamm, der gegen den Wildtyp Phagen resistent ist, die andere in einem r Gen, das die Bildung größerer und durchsichtigerer Plaques als die des Wildtyps verursacht. Diese Doppelmutanten werden als T4hr bezeichnet, der Wildtyp heißt T4h<sup>+</sup>r<sup>+</sup>. Wenn eine *E. coli* Zelle gleichzeitig mit T4h<sup>+</sup>r<sup>+</sup> und T4hr infiziert wird, treten vier verschiedene Typen unter den Nachkommen auf: die elterlichen Genotypen h<sup>+</sup>r<sup>+</sup> und hr, und außerdem die rekombinierten Genotypen hr<sup>+</sup> und h<sup>+</sup>r (Abbildung 7-18). Die Häufigkeit, mit der Rekombinanten auftreten, hängt von den jeweiligen Mutanten ab, die bei der Kreuzung verwendet werden. Kreuzungen zwischen bestimmten Genpaaren führen fast immer



**ABBILDUNG 7-17** Genetische Rekombination nach Infektion eines Bakteriums mit verschiedenen, genetisch unterschiedlichen Phagenteilchen.

zu 50% Rekombinanten; Kreuzungen zwischen anderen können etwas kleinere Werte liefern und gelegentlich treten fast keine Rekombinanten auf. Das läßt vermuten, daß auch Viren unverzweigte Genkarten haben, eine Vermutung, die heute durch eine große Anzahl sehr genauer Analysen vieler unabhängiger Mutationen völlig bestätigt wurde. Die heute am besten bekannte Genkarte ist die des Phagen T4 (Abbildung 7-19), ebenfalls ringförmig wie die von *E. coli*. Wir wissen nicht, ob alle Viren ringförmige Genkarten haben; es gibt aber schon Hinweise, daß mehrere Viren, bei denen man früher lineare Genkarten vermutete, in Wirklichkeit ebenfalls zirkuläre haben.

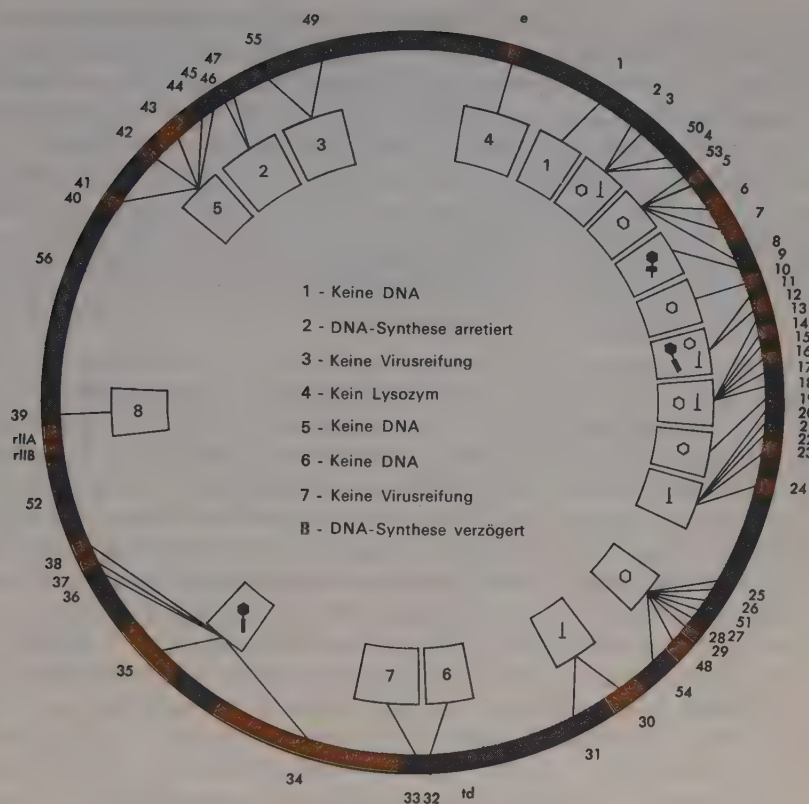


**ABBILDUNG 7-18** Plaques die man nach Infektion mit  $T2^{hr}$  und  $T2^{hr+}$  findet. Um alle 4 Typen innerhalb der Nachkommenschaft zu finden ( $hr$ ,  $h^+r^+$ ,  $h^+r$ ,  $hr^+$ ), beobachtet man die Plaques auf einer Mischung aus Stamm B und Stamm B/2. Nur Phagen, die  $h$  enthalten, töten sowohl B als auch B/2-Zellen ab. Phagen mit dem  $h^+$  Gen töten nur B Zellen; ihre Plaques schauen trübe aus, da noch lebende B/2 Zellen vorhanden sind. (Aus G. S. Senten, *Molecular Biology of Bacterial Viruses*, Freeman, San Francisco, 1963, S. 185, mit Genehmigung).

## VIELFACHE PAARUNGEN BEI VIRUS-KREUZUNGEN

Die genetische Struktur viraler Chromosomen ähnelt daher im wesentlichen der Struktur zellulärer Chromosomen. Man sollte jedoch auf eine Besonderheit der Virus-Kreuzungen hinweisen. Bei der konventionellen Meiose paart sich jedes Chromosom nur einmal; bei viralen Kreuzungen können Paarungen und Crossing-over wiederholt vorkommen, solange die Chromosomen frei





**ABBILDUNG 7-19** Die Genkarte von T4. Die Zahlen beziehen sich auf 56 Gene, in denen bedingt letale Mutationen gefunden wurden. Durch Komplementationsversuche (Kapitel 8) wurde nachgewiesen, daß es sich um unabhängige Gene handelt. Für einige Gene ist die minimale Länge angegeben (farbig). Die Länge anderer Gene (grau) ist noch nicht bekannt. In den Kästchen sind entweder Mängel bei Synthesereaktionen als Folge von Mutationen in bestimmten Genen angezeigt oder unvollständige Virusbestandteile, die man mit dem Elektronenmikroskop in infizierten Zellen findet. Die Gene links oben im Kreis kontrollieren Funktionen der ersten Hälfte des Vermehrungszyklus. Die restlichen Gene kommen in der zweiten Hälfte des Zyklus zum Ausdruck. Es ist nichts darüber bekannt, wie es zu diesem unterschiedlichen zeitlichen Auftreten kommt.

sind. Ein bestimmtes Chromosom kann daher an mehreren Paarungen und mehreren Crossing-over-Vorgängen teilnehmen. Das läßt sich leicht zeigen, indem man eine Zelle mit drei verschiedenen Viruspartikeln infiziert, von denen jede ein anderes genetisches Merkmal hat. Unter der Phagennachkom-

menschaft findet man einzelne Partikeln, die Chromosomenbereiche aller drei parentalen Phagen enthalten. Die Ergebnisse einer Phagenkreuzung sind daher im Grunde genommen die Endprodukte sehr vieler einzelner Paarungen und Crossing-over-Vorgänge. Die Häufigkeit des Crossing-over ist bei den einzelnen Viren sehr verschieden; so kann zum Beispiel das Chromosom des T4-Phagen während eines Vermehrungszyklus 5-10 mal einen Crossing-over-Prozeß durchmachen, während das Chromosom des  $\lambda$  Phagen es während dieser Zeit nur 0,5 mal tut. Die Existenz mehrfacher Crossing-over schränkt unsere Fähigkeit, eine Genkarte aufzustellen, jedoch nicht ein, da die allgemeine Regel immer noch gilt, daß eng benachbarte Gene selten rekombinieren.

Ein weiterer Unterschied zwischen Viruskreuzungen und konventionellen Meiosen mit Zellverschmelzung liegt darin, daß es keine männlichen und weiblichen Viruspartikeln gibt. Die geschlechtliche Differenzierung läßt sich als ein Mechanismus auffassen, der eine Zellverschmelzung zwischen genetisch verschiedenen Organismen möglich macht. Viruspartikeln jedoch brauchen nicht miteinander zu verschmelzen, da eine genetische Rekombination immer dann eintritt, wenn zwei Viruschromosomen verschiedener Genotypen in eine einzige Wirtszelle eindringen. Außerdem kann in Zellen, die mit mehreren genetisch unterschiedlichen Viren infiziert wurden, ein Crossing-over sowohl zwischen genetisch identischen als auch zwischen genetisch verschiedenen Chromosomen eintreten; deshalb führt nur ein kleiner Bruchteil aller möglichen tatsächlichen Crossing-over-Vorgänge in einer mit verschiedenen Viren infizierten Zelle zu Rekombinanten eines neuen Genotyps. Es gibt ebenfalls Befunde dafür, daß Crossing-over auch nach Infektion mit nur einer einzigen Viruspartikel möglich ist. Dieses Phänomen läßt sich natürlich nicht durch genetische Analysen nachweisen, da alle Chromosomen der Nachkommen genetisch identisch sind; Versuche mit durch Isotopen markierten Viren (vergleiche Kapitel 9) sind notwendig, um dieses Phänomen aufzuzeigen.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Chromosomen bestimmen die vererbaren Eigenschaften aller Zellen; sie sind lineare Ansammlungen spezifischer genetischer Faktoren, der sogenannten Gene. Jedes Gen kann die Eigenschaften einer Zelle auf sehr spezifische Weise beeinflussen. Das zeigt sich daran, daß vererbare Veränderungen dieser Genstrukturen (Mutationen) eindrucksvolle Auswirkungen auf die Zellen haben: verschiedene Mutationen verändern zum Beispiel die Augenfarbe oder die Körpergröße eines Organismus. Obwohl spontane Mutationen nur sehr selten eintreten, ist es möglich, die Häufigkeit von Mutationen durch die Anwendung spezifischer Chemikalien oder Strahlen (Mutagene) zu erhöhen.*

Die meisten frühen genetischen Untersuchungen beschäftigen sich mit großen, komplizierten diploiden Pflanzen und Tieren. Heute jedoch sind die beliebtesten Objekte für Untersuchungen darüber, was Gene sind und wie sie wirken, die haploiden Mikroorganismen, wie Bakterien und ihre Viren, die sogenannten Bakteriophagen. Sie haben den Vorteil kurzer Vermehrungszyklen und lassen sich leicht unter Laboratoriumsbedingungen züchten.

Bakterienmutanten mit veränderten Wachstumsfaktoren und Resistenz gegen Antibiotika und Viren sind besonders nützlich, da Wildtyp und Mutanten sehr leicht voneinander getrennt werden können. Das gleiche gilt auch für Phagenmutanten, deren Wirtsspektrum und Temperaturempfindlichkeit verändert sind.

Die Anordnung der Gene auf den Chromosomen läßt sich durch Untersuchung der Gen-Segregation bei genetischen Kreuzungen ermitteln. Rekombinationen von Allelen können sowohl durch zufällige Kombination der Chromosomen als auch durch Crossing-over homologer Chromosomen bewirkt werden. Wir können nachweisen, ob bestimmte Gene auf verschiedenen oder auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind, je nachdem ob sie sich, wie Chromosomen, unabhängig voneinander vererben oder ob sie eine (mehr als 50-prozentige) Kopplung zeigen. Crossing-over homologer Chromosomen liefert die Grundlage für die Bestimmung der relativen Anordnung der Gene auf den Chromosomen (Genkartierung). Je häufiger es zwischen zwei Genen zu Crossing-over kommt, um so weiter voneinander entfernt müssen diese Gene sein. Wenn man gleichzeitig drei Gene verfolgt (Drei-Faktor-Kreuzung); ist die am wenigsten häufige Rekombinante das Ergebnis eines doppelten Crossing-over; die Bestimmung dieser Rekombinante liefert eine Kontrolle für Zwei-Faktor-Kreuzungen mit den gleichen drei Genkombinationen.

Die meisten genetischen Kreuzungen, die das Ziel verfolgen, etwas über die Natur der Gene zu erfahren, werden heute mit Bakterien und Phagen durchgeführt, bei denen die typische Meiose nicht abläuft. Bei Bakterienkreuzungen kommt es meistens zu einem Crossing-over zwischen einem Chromosomenfragment und einem intakten Chromosom. Genetische Rekombination bei Bakterien erfolgt als Ergebnis einer Paarung männlicher (Hfr) mit weiblichen Zellen (Konjugation), durch Infektion mit einem Phagen, der genetisches Material seines vorherigen Wirtes mitschleppt (Transduktion) und durch Zufuhr eines Extrakts (DNA) aus genetisch fremden Chromosomen (Transformation). Phagenkreuzungen sind möglich, wenn eine Bakterienzelle mit zwei oder mehr genetisch unterschiedlichen Phagen infiziert wird; dabei können mehrere Zyklen von Paarungen und Crossing-over ablaufen. Trotz der Schwierigkeiten, die diese Phänomene für die Phagen- und Bakteriengenetik bedeuten, entwickeln sich das E. coli- und das T4-Phagen-Chromosom zu dem am besten verstandenen genetischen Material.

## LITERATUR

- Hayes, W., *The Genetics of Bacteria and Their Viruses; Studies in Basic Genetics and Molecular Biology*, 2. Aufl., Wiley, New York, 1969. Eine umfassende Beschreibung der genetischen Systeme von Viren und Bakterien, die zeigt, wie diese für die Aufklärung der Grundprinzipien molekularer Genetik benützt wurden.
- Stent, G. S., *Molecular Biology of Bacterial Viruses*, Freeman, San Francisco, 1963. Ein Beispiel für jene Seltenheit - ein nahezu perfektes Buch. Hier werden frühere und derzeitige Vorstellungen über Bakterienviren luzid geboten.
- Adelberg, E. A. (Ed.), *Papers on Bacterial Genetics*, 2. Aufl., Little, Brown, Boston, 1966. Eine Sammlung bedeutender Sonderdrucke über die Entwicklung der Bakteriengenetik.
- Stent, G. S. (Ed.), *Papers on Bacterial Viruses*, 2. Aufl., Little, Brown, Boston, 1965. Eine Sammlung vieler derjenigen Veröffentlichungen, die die Entwicklung der gegenwärtigen Forschung mit Bakterienviren gestaltet haben.
- Whitehouse, H. L. K., *Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity*, 2. Aufl., Edward Arnold, London, 1969. Eine sehr gute Abhandlung über allgemeine Genetik mit besonderer Betonung von Crossing-over.
- Herskowitz, I. H., *Basic Principles of Molecular Genetics*, Little, Brown, Boston, 1967. Eine gründliche Erörterung vieler Aspekte der molekularen Genetik.



# 8

## STRUKTUR UND FUNKTION DER GENE

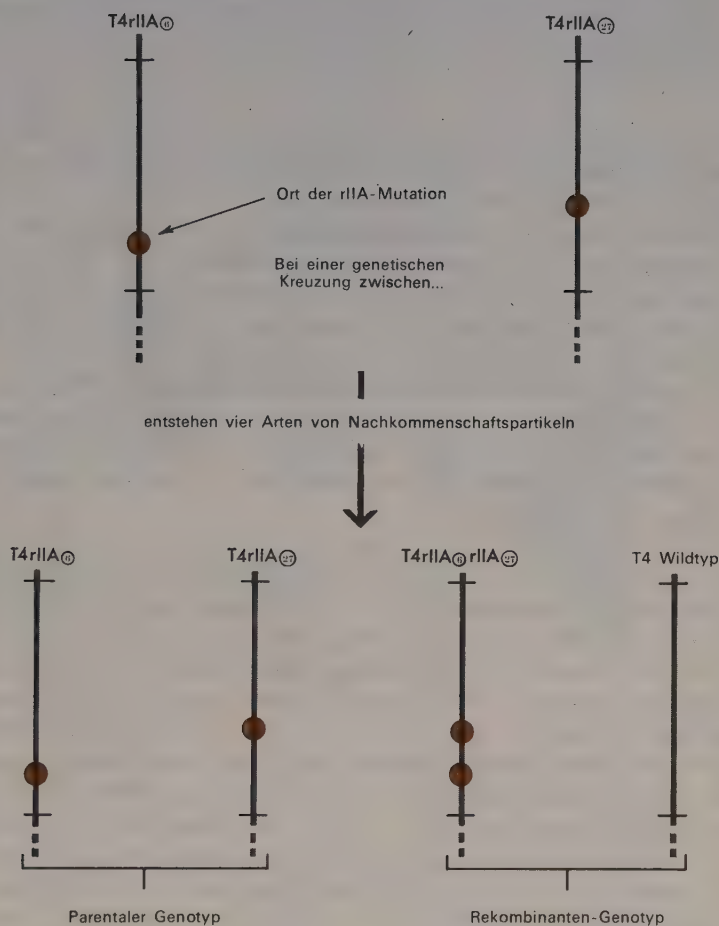
Lange Zeit dachte man allgemein, daß Crossing-over zwischen Genen erfolgt, aber nie innerhalb der Gene selbst. Man stellte sich das Chromosom als eine Kette von Genen vor, die durch irgendein nicht genetisches Material zusammengehalten wird, ungefähr wie eine Perlenkette. Heute wissen wir jedoch, daß diese Vorstellung völlig falsch ist - genau das Gegenteil dürfte wahr sein: möglicherweise findet alles Crossing-over nur durch Brüche und Wiedervereinigung der Gene selbst statt. Der ursprüngliche Eindruck war dadurch entstanden, daß Crossing-over zwischen Chromosomenbezirken um so leichter zu beobachten ist, je weiter diese Bezirke voneinander entfernt sind. Wenn sie sehr eng benachbart sind, ist die Rekombination äußerst selten und kann nur durch die Untersuchung sehr großer Zahlen von Nachkommen entdeckt werden. Intragene Rekombinationen konnten daher nicht untersucht werden, solange sich die Genetik auf die Untersuchung höherer Organismen beschränkte. Sogar bei der sehr gründlich analysierten Fruchtfliege *Drosophila* ist es kaum möglich, mehr als 50.000 Nachkommen einer einzigen Kreuzung zu untersuchen. Neuere Techniken erlauben jedoch die rasche Überprüfung von Millionen Nachkommen aus einer einzigen Kreuzung zwischen genetisch verschiedenen Schimmelpilzen, Hefen, Bakterien oder Viren. Mit Hilfe dieser Organismen war es einfach, nachzuweisen, daß Crossing-over auch zur Rekombination innerhalb eines Gens führen kann. Jedes Gen enthält eine Anzahl verschiedener Stellen, an

denen Mutationen stattfinden und zwischen denen Crossing-over möglich ist. Dieses Ergebnis lieferte eine sehr wirksame Methode, die topologische Struktur der Gene zu untersuchen.

## REKOMBINATION INNERHALB DER GENE ERMÖGLICHT GENKARTIERUNG

Die bisher eindrucksvollsten Ergebnisse über die Feinstruktur der Gene selbst lieferten die Untersuchungen der Gene rIIA und rIIB des Bakteriophagen T4. Es handelt sich dabei um benachbarte Gene, die die Länge des Vermehrungszyklus der T4-Phagen beeinflussen; Mutationen in diesen Genen verändern daher die Größe der Plaques, die in einem Bakterienrasen auf einer Agarplatte entstehen. Eine Mutation sowohl im rIIA als auch im rIIB-Gen kann den Vermehrungszyklus des T4-Phagen in einer *E. coli* Zelle verkürzen. T4-infizierte Zellen auf einer Agarplatte brechen normalerweise erst mehrere Stunden nach der Infektion auf und geben dabei die neugebildeten Partikeln frei. Zellen, die mit rII-Mutanten infiziert worden waren, lysieren jedoch schneller (r = rapid; II deutet an, daß auch andere Gene eine rasche Zellyse hervorrufen können). Daher erzeugen rII-Mutanten größere Plaques als der Wildtyp. Diese rII-Mutanten wurden als Versuchssubjekt gewählt, weil es leicht möglich ist, eine sehr kleine Anzahl von Wildtyp-Phagen unter sehr vielen Mutanten zu entdecken. Wildtyp und rII-Mutanten wachsen gleich gut auf *E. coli*-Stamm B, während auf einem anderen Stamm, *E. coli* K ( $\lambda$ ) nur der Wildtyp wachsen kann. Werden nun die Nachkommen einer genetischen Kreuzung zwischen zwei verschiedenen rII-Mutanten zu K 12( $\lambda$ )-Zellen zugegeben, können nur die rekombinierten Wildtyp-Phagen Plaques bilden. Eine einzige Wildtyp-Rekombinante läßt sich unter  $10^6$  Nachkommen ohne Schwierigkeiten herausfinden.

Über zweitausend voneinander unabhängige Mutationen in den rIIA- und rIIB-Genen wurden isoliert und in Kreuzungsexperimenten eingesetzt. In einem typischen Kreuzungsversuch wurde *E. coli* B mit zwei Phagenpartikeln infiziert, die jeweils eine unabhängig isolierte rIIA (oder rIIB) Mutation trugen. Bei der Vermehrung der Viruspartikeln fand Rekombination statt. Die Nachkommen wurden dann auf *E. coli* K ( $\lambda$ ) gezüchtet, um auf den Wildtyp getestet zu werden. Bei einer sehr großen Zahl der Kreuzungen ließen sich normale Partikeln nachweisen, was auf Rekombinationen innerhalb eines Gens hinwies (Abbildung 8-1). Wenn nämlich Rekombinationen nur zwischen Genen möglich wären, könnten aus einer Kreuzung zweier Phagen, die im gleichen Gen mutiert sind, keine Wildtyp-Rekombinanten entstehen. Ein ganzes Spektrum von Rekombinationshäufigkeiten



**ABBILDUNG 8-1** Die Verwendung von T4II-Mutationen, um Crossing-over innerhalb eines Gens nachzuweisen. Wildtyp und doppelte r-Rekombinanten treten mit gleicher Häufigkeit auf. Die Wildtyp-Rekombinanten sind leicht zu finden, da sie der einzige Genotyp unter der Nachkommenschaft sind, der auf K12 ( $\lambda$ ) Plaques bildet. Es ist viel schwieriger die Doppelrekombinanten  $rIIA_{67}rIIA_{27}$  zu identifizieren, da ihre Plaques von denen der Einfachmutanten nicht zu unterscheiden sind. Um sie zu finden, muß man eine große Zahl von Nachkommenschafts-r-Viren isolieren, die den r Phänotyp zeigen, und sie für neue genetische Kreuzungen mit dem parentalen r-Stamm verwenden. Die doppelten r-Mutanten führen nicht zu Wildtyp-Rekombinanten, wenn man sie mit einer der einfachen r-Mutanten kreuzt.

wurde ermittelt, ganz so wie bei Mutationen in verschiedenen Genen. Die Streuung der Werte läßt erkennen, daß einige Mutationen enger benachbart sind als andere und erlaubt, Genkarten für beide Gene zu konstruieren. Eine Prüfung dieser Karten führt zu den folgenden, außergewöhnlichen Schlußfolgerungen:

1) Innerhalb eines Gens befinden sich eine große Anzahl verschiedener mutierbarer Stellen. Diese Zahl beträgt für die beiden rIIA, und rIIB-Gene insgesamt etwa 1000 bis 1500 (Abbildung 8-2).

2) Die Genkarten von rIIA und rIIB sind eindeutig linear, ein starker Hinweis darauf, daß das Gen selbst linear konstruiert ist.

3) Die meisten Mutationen sind Veränderungen nur an einem einzigen Mutationsort. Derart mutierte Gene können sich durch eine zweite (Rück-) Mutation am Ort der ersten in den Wildtyp zurückverwandeln.

4) Andere Mutationen führen zum Verlust (Deletion) ganz beträchtlicher Abschnitte der Genkarte, was eine Folge eines tatsächlichen Verlustes von einem Teil des rII-Gens ist (Abbildung 8-3). Es ist sehr unwahrscheinlich, daß Mutationen, bei denen mehrere mutierbare Stellen gleichzeitig fehlen, zum Wildtyp zurückmutieren.

Auch die genetische Feinstruktur einer Anzahl anderer viraler und bakterieller Gene wurde ausführlich kartiert. Die Längen dieser Karten sind von Gen zu Gen verschieden, was nahelegt, daß einige Genprodukte größer als andere sind. Andere Untersuchungen waren zwar nicht so ausführlich wie die an rII-Genen, aber sie führten alle zu den gleichen Schlußfolgerungen: in allen Genen können an sehr vielen Stellen innerhalb des Gens Mutationen stattfinden und diese mutationsfähigen Orte sind strikt linear angeordnet. Das Bild, das sich daher ein Genetiker von einem Gen macht, ist folgendes: *das Gen ist ein umschriebener Bezirk eines Chromosoms, der 1. für die Produktion eines bestimmten, spezifischen Zellproduktes verantwortlich ist und der 2. aus einer linearen Anordnung potentieller Mutationsorte besteht, von denen jeder in verschiedenen Formen existieren kann und zwischen denen Crossing-over möglich ist.*

#### DER KOMPLEMENTATIONS-TEST ZEIGT, OB ZWEI MUTATIONEN IM GLEICHEN GEN LIEGEN

Da Mutationen sowohl im rIIA- als auch im rIIB-Gen zu größeren Plaques führen, ist eigentlich die Frage berechtigt, warum man sie als zwei verschiedene Gene betrachtet. Wäre es nicht einfacher, man würde in ihnen zwei Teile eines und desselben Gens sehen? Die Antwort ist klar und einfach



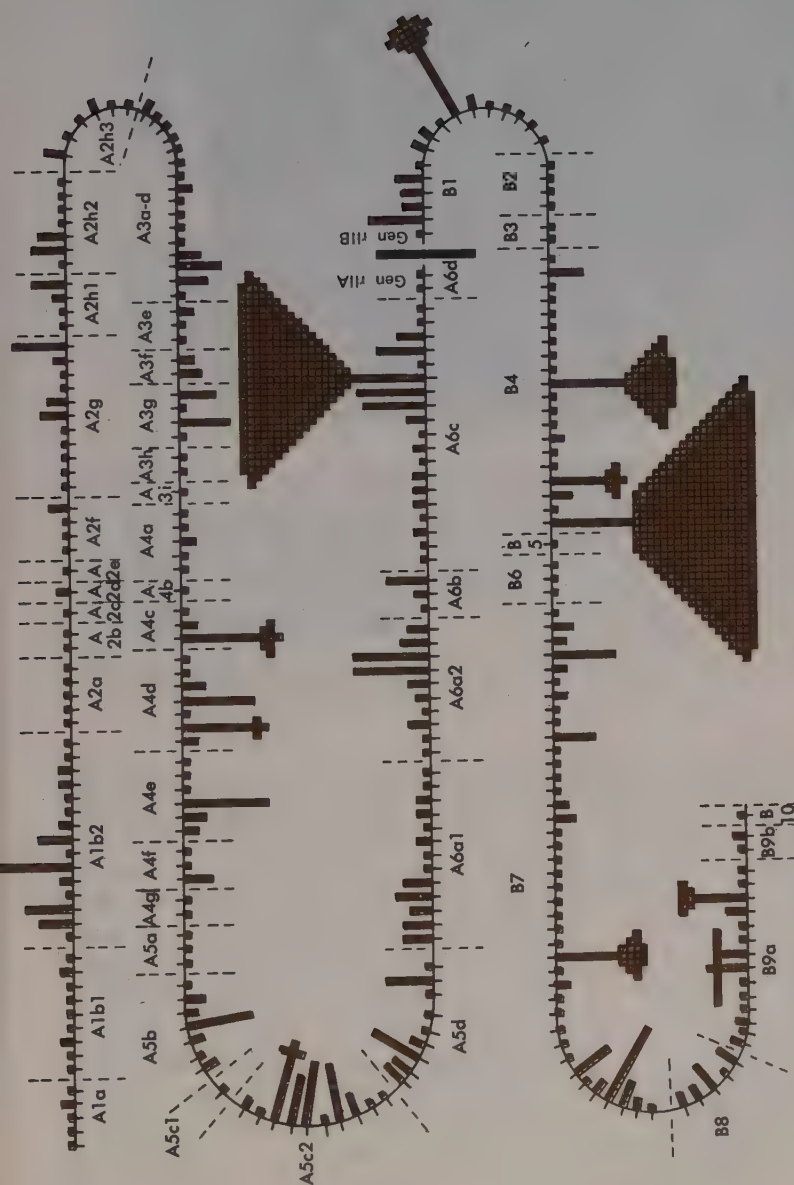
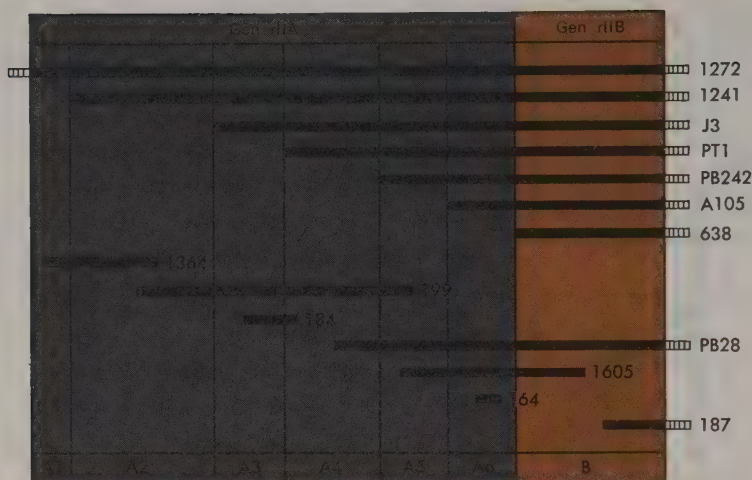


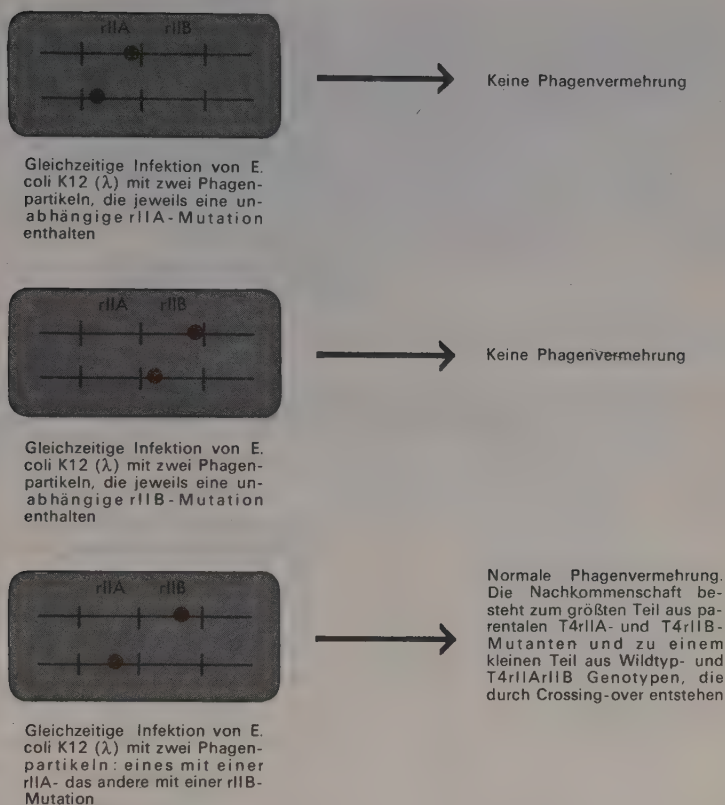
ABBILDUNG 8-2 Die Genkarte der *rIIA*- und *rIIB*-Gene des T4-Phagen. Die Karte zeigt die Zuordnung einer großen Zahl verschiedener Mutationen in bestimmten Regionen (A1a, A1b, etc.) des Gens. In den meisten Fällen ist die Reihenfolge der Mutationen in einer bestimmten Region noch nicht bekannt. Jedes Quadrat entspricht einer unabhängigen Mutation an einer bestimmten Stelle des Chromosoms. Einige Regionen ('hot spots') mutieren also viel häufiger als andere [Aus S. Benzer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 410 (1961), mit Genehmigung].



**ABBILDUNG 8-3** Deletionsmutationen innerhalb der *rII*-Region von T4-Phagen. Ungefähr 10% der spontanen *rII*-Mutationen können nicht an einem bestimmten Punkt kartiert werden. Sie sind auf die Deletion einer großen Zahl benachbarter mutierbarer Stellen zurückzuführen. Einige Deletionen, z.B. 1272, betreffen sowohl *rIIA* als auch *rIIB*-Gene. Die kleinen Rechtecke deuten an, daß die Deletion sich wahrscheinlich in das benachbarte Gen erstreckt. Das Vorkommen von Deletionsmutationen hat die Genkartierung erheblich erleichtert. Wenn man eine neu isolierte *rII* Mutante mit einer Zahl von Deletionsmutationen kreuzt, die zunehmend größere Regionen betreffen, kann man unmittelbar der neu isolierten Mutante einen ungefähren Platz auf der Genkarte zuweisen. Auf dieser Karte wurde die Größe des *rIIB*-Gens willkürlich reduziert.

Wenn *E. coli*-Stamm K12 ( $\lambda$ ) gleichzeitig mit einer T4rIIA- und einer T4rIIB-Mutante infiziert wird, so vermehren sich die Chromosomen beider Viren und neue Viruspartikeln werden gebildet (Abbildung 8-4). Im Gegensatz dazu führt die gleichzeitige Infektion von K12 ( $\lambda$ ) entweder mit zwei verschiedenen T4rIIA- oder zwei verschiedenen T4rIIB-Mutanten zu keiner Virusvermehrung. Das zeigt, daß die *rIIA*- und *rIIB*-Gene zwei verschiedene Funktionen ausüben, die beide für die Vermehrung auf K12 ( $\lambda$ ) notwendig sind.

Wird eine *E. coli*-Zelle mit einer einzigen T4rIIA-Mutante infiziert, so drückt sich zwar das *rIIB*-Gen des Phagen normal aus, eine aktive Form des *rIIA*-Produktes steht aber nicht zur Verfügung; deshalb kann keine Virusvermehrung stattfinden. Entsprechend wird bei der Infektion mit einer einzelnen *rIIB*-Mutante zwar ein aktives *rIIA*-Produkt gebildet, das *rIIB*-Produkt aber entsteht nur in einer inaktiven Form oder überhaupt nicht. Virusvermehrung findet nur dann statt, wenn wir ein Bakterium gleichzeitig mit einer *rIIA*- und einer *rIIB*-Phagenmutante infizieren, da in diesem Fall jedes mutierte Phagenchromosom gerade das Genprodukt hervorbringen kann, das vom Chro-



**ABBILDUNG 8-4** Beweis, daß die *rII* Region aus zwei verschiedenen Genen besteht, die einander bei gleichzeitiger Infektion komplementieren können.

mosom der anderen Phagenmutante nicht produziert wird. Zwei Chromosomen können sich daher gegenseitig ergänzen (*komplementieren*), wenn die Mutationen in zwei verschiedenen Genen vorkommen, was man durch den Komplementationstest feststellen kann. Dieses Experiment wird nicht durch mögliches intragenes Crossing-over zwischen den beiden Mutanten zu Wildtyp-Phagen beeinträchtigt, da die Zahl solcher Rekombinanten sehr klein ist; im Gegensatz dazu führt die Komplementation zwischen zwei verschiedenen Mutanten zu einer normalen Menge von Phagennachkommenschaft. Es ist leicht, einen solchen Komplementationstest mit Phagenmutanten durchzuführen. Alles, was man tun muß, ist ein Bakterium mit zwei verschiedenen Mutanten gleichzeitig zu infizieren. Dies erzeugt automatisch eine Zelle, die von jedem mutierten Chromosom ein Exemplar enthält. Es ist schwieriger,

Komplementationsteste mit normalerweise haploiden Zellen wie *E. coli* auszuführen. Aber glücklicherweise erlauben genetische Tricks, deren Erörterung hier zu weit führen würde, die Erzeugung spezieller Stämme, in denen einige Chromosomenabschnitte doppelt vorkommen (partiell diploide Stämme). Diese waren oft für den Nachweis sehr nützlich, daß ein Chromosomenabschnitt, von dem man ursprünglich annahm, er enthielte nur ein Gen, in Wirklichkeit mehrere Genprodukte hervorbringt und daher eine entsprechende Zahl von unabhängigen Genen enthalten muß.

## GENETISCHE KONTROLLE DER PROTEINFUNKTION

Eine direkte Beziehung zwischen Genen und Enzymen wurde schon 1909 vermutet, als man den Phenylalanin-Stoffwechsel in Patienten, die an einer bestimmten Erbkrankheit litten, untersuchte. Aber erst in den zehn Jahren nach 1941, als eine Vielzahl verschiedener Wachstumsfaktoren für *Neurospora* und *E. coli* bekannt geworden waren, wurde die Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese zu einer anerkannten Tatsache. Einen der ersten Beweise lieferte die Biosynthese der Aminosäure Arginin. Dieser Syntheseweg beginnt mit Glutaminsäure und läuft dann über acht Reaktionsstufen, von denen jede durch ein spezifisches Enzym katalysiert wird (Abbildung 8-5). Für jeden dieser acht Schritte konnten Mutanten isoliert werden, welche die spezifische enzymatische Reaktion nicht mehr ausführen können. Man kann daraus schließen, daß die Synthese eines jeden Enzyms von einem eigenen Gen kontrolliert wird, eine Hypothese, die dadurch bestätigt wurde, daß in Extrakten aus solchen Mutanten die entsprechenden aktiven Enzyme fehlten. Die Biosynthese des Histidins (Abbildung 8-6) lieferte ein weiteres schönes Beispiel für diese Beziehungen: auch in diesem Fall gibt es spezifische Mutationen, die zum Verlust jeweils eines der zehn Enzyme führen, die für diese Biosynthese notwendig sind.

Enzyme sind nicht die einzigen Proteine, die direkt von Genen kontrolliert werden. Jedes spezifische Protein wird durch ein eigenes Gen kontrolliert. Einen der ersten klaren Beweise für diese Vorstellung lieferten Untersuchungen der Hämoglobine von Patienten, die an Sichelzellanämie erkrankt waren. Die genetische Grundlage dieser Krankheit wurde sorgfältig untersucht und aufgeklärt. Wenn das Sichel-Gen (s) in beiden homologen Chromosomen vorliegt, kommt es zu einer schweren Anämie, die durch sichelförmige rote Blutkörperchen charakterisiert ist. Wenn nur ein s-Gen vorliegt, und das Allel im homologen Chromosom normal (+) ist, ist die Anämie weniger schwer und die roten Blutkörperchen sind fast normal. Der Typ des Hämoglobins in den roten Blutzellen ist in ganz ähnlicher Weise mit der genetischen Situation verknüpft. Im ss-Fall ist das gesamte Hämoglobin von einem



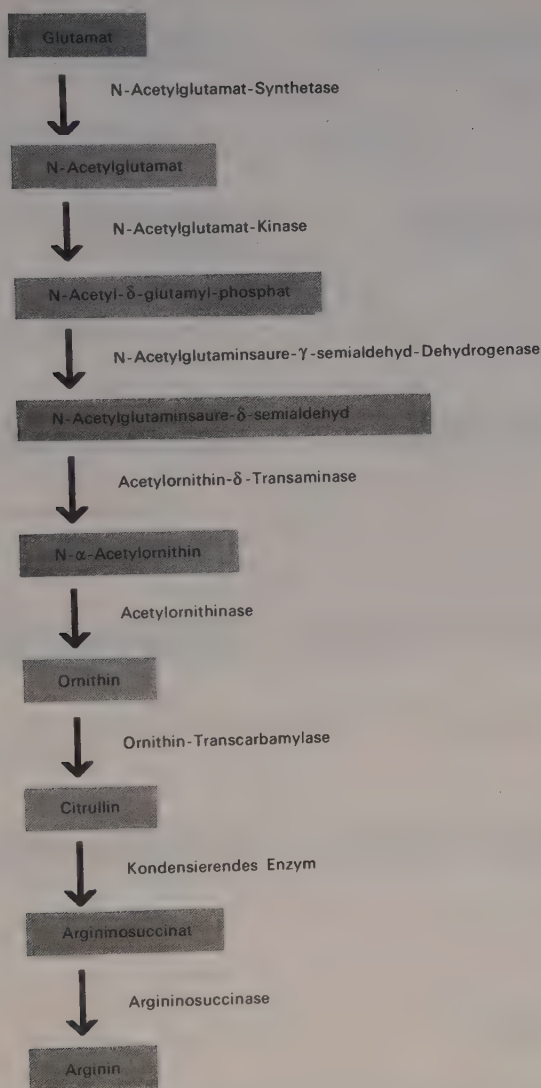
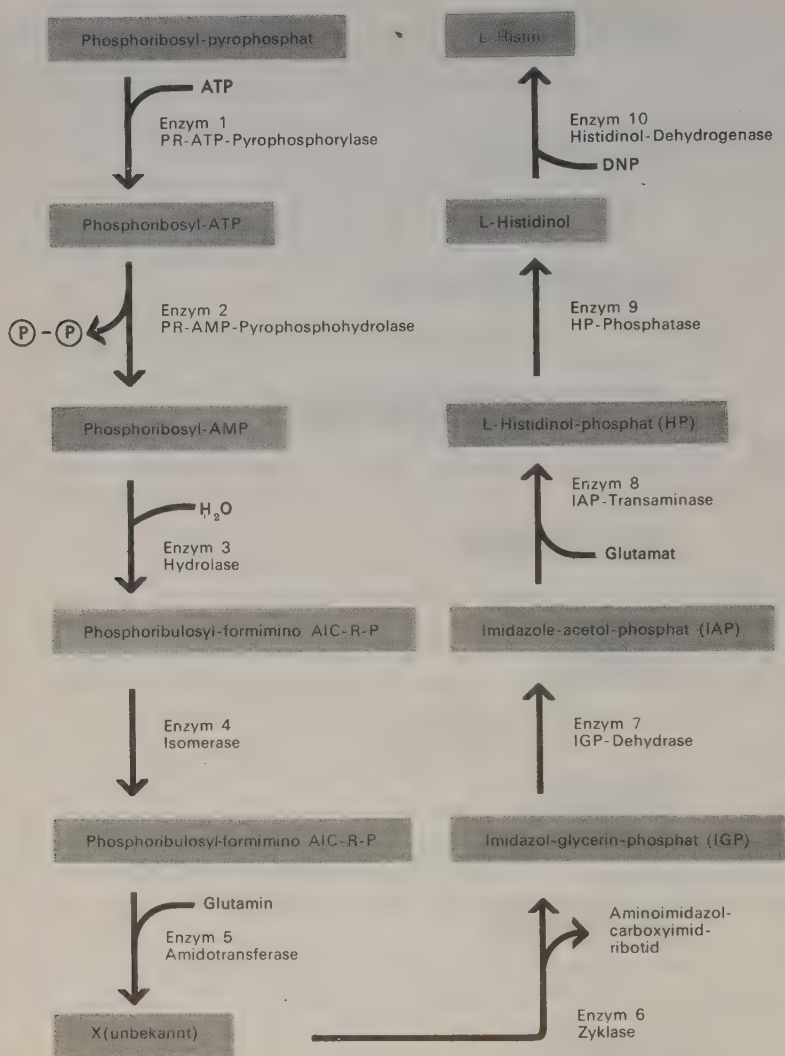


ABBILDUNG 8-5 Stoffwechselweg der Argininbiosynthese in *E. coli*.

abnormen Typ, der durch eine veränderte Löslichkeit charakterisiert ist, während im Fall von +s die Hälfte der Hämoglobinmoleküle normal ist, die andere aber der Sichelform entspricht.

Auch heute noch ist es sehr schwer, das Proteinprodukt eines bestimmten



**ABBILDUNG 8-6** Stoffwechselweg der Histidinbiosynthese in *Salmonella tryphimurium*. Dieses Bakterium, das nahe mit *E. coli* verwandt ist, scheint ein Chromosom mit ähnlicher Genanordnung zu haben.

Gens zu identifizieren. Einer der ärgerlichsten Fälle betrifft die rII-Region des T4-Phagen. Wir kennen immer noch nicht die biochemischen Veränderungen, die den größeren Plaques der rII-Phagenmutanten zugrunde liegen, und trotz vieler Anstrengungen wurde bisher noch kein spezifisches Protein

gefunden, das in *E. coli*-Zellen, die mit T4rII-Mutanten infiziert wurden, fehlt und in Zellen, die mit Wildtyp-Phagen infiziert wurden, vorhanden ist. Man bevorzugt daher heute bei der genetischen Analyse Gene, deren Proteinprodukte wir heute schon isolieren können.

## EIN GEN - EINE POLYPEPTIDKETTE

Bis vor kurzem hatte man die gerade erörterten Vorstellungen unter dem Schlagwort «Ein Gen - Ein Protein (Enzym)» zusammengefaßt. Heute wissen wir, daß diese Aussage richtiger «Ein Gen - Eine Polypeptidkette» heißen muß. Wenn ein Protein mehr als eine Polypeptidkette enthält, wird jede Kette getrennt synthetisiert. Erst nach ihrer Synthese aggregieren sie zum endgültigen Protein. Im allgemeinen werden die beiden oder mehreren Polypeptidketten, die für ein funktionsfähiges Protein gebraucht werden, von den benachbarten Genen gesteuert. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Die Synthese der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins werden nicht von gekoppelten Genen kontrolliert. Der Komplementationstest sagt uns also eigentlich nicht, ob zwei Gene zwei verschiedene *Proteine*, sondern vielmehr, ob sie zwei verschiedene Polypeptidketten kontrollieren.

## REZESSIVE GENE BILDEN HÄUFIG KEINE FUNKTIONSFÄHIGEN PRODUKTE

Die meisten mutierten Gene sind, verglichen mit den Wildtyp-Genen, rezessiv. Diese Tatsache, die die ersten Genetiker verwundert hatte, kann man heute im Rahmen der Gen-Enzym-Beziehung verstehen. Der rezessive Phänotyp beruht oft darauf, daß die mutierten Gene nicht mehr in der Lage sind, irgendein funktionsfähiges Protein (Enzym) zu bilden. In Heterozygoten jedoch gibt es immer noch ein «gutes» Gen und dementsprechend auch eine Anzahl guter Genprodukte. Da das Wildtyp-Gen in Heterozygoten nur einmal vorkommt, wäre es möglich, daß es in Heterozygoten immer weniger gute Kopien des zuständigen Proteins gibt als in Individuen mit zwei Wildtyp-Genen. Wäre das der Fall, könnten wir vermuten, daß der heterozygote Phänotyp zwischen den beiden homozygoten Phänotypen liegt. Gewöhnlich ist dies jedoch nicht der Fall: entweder sind trotz reduzierter Zahl immer noch genügend funktionsfähige Moleküle für die Katalyse der entsprechenden Stoffwechselreaktionen vorhanden, oder das rezessive Gen macht sich deshalb nicht bemerkbar, weil bestimmte Kontrollmechanismen das unveränderte Gen in einer Heterozygoten veranlassen, mehr Genprodukte zu produzieren, als es jedes Wildtyp-Gen in einer Homozygoten tut. In Kapitel

14 werden wir sehen, wie die Geschwindigkeit, mit der ein Gen arbeitet, kontrolliert werden kann.

## GENE MIT VERWANDTEN FUNKTIONEN SIND OFT BENACHBART

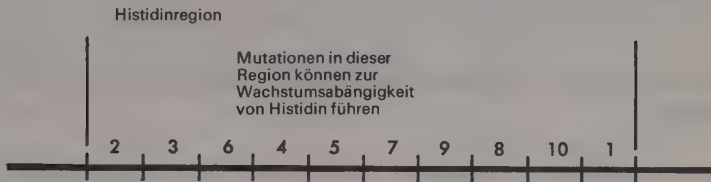
Bis vor zehn Jahren glaubten die Genetiker, daß die Anordnung der Gene auf den Chromosomen rein zufällig sei. Es schien keine Hinweise zu geben, daß Gene mit verwandten Wirkungen auch nahe beieinander auf den Chromosomen liegen. Heute weiß man jedoch aus der Phagen- und Bakteriengenetik, daß ein beachtlicher Anteil aller Gene in Gruppen zusammenliegt, die verwandte Funktionen ausüben. Für diesen Wandel gibt es zwei Gründe.

Erstens untersuchen heute viele Genetiker solche Mutationen, die die Biosynthese bekannter zellulärer Moleküle direkt beeinflussen. Vor der Ära der Bakterien- und Phagengenetik bezogen sich die meisten genetischen Markierungen auf sehr komplizierte Eigenschaften wie Augenfarbe oder Form der Flügel. Die Entwicklung von Flügeln oder Augen ist vom chemischen Standpunkt phantastisch kompliziert; es ist klar, daß es eine große Zahl chemischer *Reaktionen*, die *nichts miteinander zu tun haben*, gibt, deren Fehlen zu einem mißgebildeten Flügel führen könnte. Es überrascht daher nicht, daß Gene, die die Flügel beeinflussen, an vielen Stellen aller vier *Drosophila*-Chromosomen vorkommen. Im Gegensatz dazu gibt es auch Mutationen, die sich dadurch bemerkbar machen, daß ein relativ einfaches Molekül, wie beispielsweise die Aminosäure Serin, nicht mehr synthetisiert werden kann. Bei solchen Mutationen ist es sehr wahrscheinlich, daß sie durch das Fehlen einer oder weniger miteinander *verwandter chemischer Reaktionen* verursacht werden. Wenn verwandte Gene tatsächlich nebeneinander auf den Chromosomen angeordnet sind, so können wir das Phänomen dann am besten beobachten, wenn wir Mutationen untersuchen, denen ohne weiteres eine bestimmte chemische Störung zugeordnet werden kann.

Der zweite Grund, warum wir heute häufig benachbarte Gene mit verwandten Funktionen finden, liegt darin, daß wir heute über den Komplementationstest verfügen. In vielen Fällen zeigt dieser Test, daß ein chemischer Vorgang komplizierter ist als ursprünglich angenommen. Die Aufspaltung der rII-Region in rIIA- und rIIB-Gene ist ein typischer Fall. Oft ließ sich durch Komplementationsteste zeigen, daß Chromosomenorte, denen man früher nur ein einziges Gen zuordnete, in Wirklichkeit eine Anzahl verschiedener, wenn auch verwandter Aufgaben erfüllen. Spätere biochemische Untersuchungen haben dann gezeigt, daß mehrere chemische Reaktionen (Enzyme) beteiligt sind. Eines der spektakulärsten Beispiele ist die Histidinsynthese in *E. coli*. Vor 20 Jahren hätten wir vermutet, daß eine Reihe von Mutationen, die die Histidinsynthese blockieren, und die alle in der



gleichen Chromosomenregion kartiert werden, alle zu einem und demselben Gen gehören müßten. Es wurden jedoch jetzt zehn verschiedene Gene in dieser Region identifiziert (Abbildung 8-7). Jedes dieser Gene ist für ein bestimmtes Enzym in der Biosynthese des Histidins (ausgehend von Phosphoribosyl-pyrophosphat) verantwortlich. Ganz ähnlich enthält die Chromosomenregion, die für die Tryptophansynthese verantwortlich ist, eine Gruppe von fünf verschiedenen Genen; jedes dieser Gene wird für einen bestimmten Schritt (Enzym) in der Biosynthese des Tryptophans gebraucht.



**ABBILDUNG 8-7** Benachbarte Anordnung der Gene, die an der Biosynthese des Histidins in dem Bakterium *Salmonella typhimurum* beteiligt sind. Die Reihenfolge der Gene wurde durch Transduktionsversuche bestimmt. Jedes der Gene ist für die Synthese eines der zehn Enzyme verantwortlich, die für die Umwandlung von Phosphoribosyl-pyrophosphat in Histidin gebraucht werden. Die Gene sind hier mit Zahlen vom 1-10 bezeichnet. Enzym 1 katalysiert den 1. Reaktionsschritt der Biosynthese, Enzym 2 den zweiten, etc. Die Namen dieser Enzyme sind in Abbildung 8-6 angegeben.

Zunächst hatte man gedacht, daß die einzelnen Gene in einer Gruppe so angeordnet sind wie die entsprechenden Enzyme innerhalb der Biosynthesekette. Heute kennt man jedoch mehrere Ausnahmen zu dieser Regel. Zum Beispiel liegen die ersten beiden Enzyme der Histidinsynthese an entgegengesetzten Enden der Gengruppe.

Gruppen verwandter Gene sind nicht immer mit der Biosynthese wichtiger Stoffwechselprodukte verbunden. Auch der Abbau vieler Nährstoffmoleküle, wie beispielsweise der Zucker Galactose oder Lactose, erfordert ebenfalls mehrere aufeinander folgende chemische Reaktionen; auch diese werden häufig durch benachbarte Gene kontrolliert. Der Galactoseabbau läuft über drei spezifische chemische Schritte; für den Abbau der Lactose sind mindestens zwei, wahrscheinlich drei verschiedene Gene erforderlich. Ein anderes aussergewöhnliches Beispiel benachbarter, verwandter Gene betrifft die genetische Kontrolle verschiedener Strukturproteine in der schützenden Hülle des T4-Phagen. Die Gene, die die Synthese der Kopfproteine beeinflussen, liegen in einer anderen Region als die Gene, die die Schwanzfasern kontrollieren.

Die Gruppierung verwandter Gene hängt mit der Tatsache zusammen, die wir ausführlich im Kapitel 14 besprechen werden, daß nicht alle Gene

gleichzeitig aktiv sind. Es gibt Mechanismen, die die Gene veranlassen, in Aktion zu treten oder nicht. Zum Beispiel funktionieren die Gene, die den Lactosestoffwechsel kontrollieren, nur dann, wenn eine Zelle auf Lactose wächst; fehlt jedoch die Lactose, besteht kein Bedarf für diese Gene, zu arbeiten. Das An- und Abschalten dieser Gene wird durch ein spezifisches Molekül, den Lactose-Repressor, kontrolliert. Wie wir in Kapitel 14 sehen werden, beruht die Fähigkeit dieser Repressormoleküle, gleichzeitig die Synthese mehrerer Enzyme zu kontrollieren, gerade auf der Tatsache, daß die entsprechenden Gene einander benachbart sind.

### **BEWEIS, DASS GENE DIE AMINOSÄURESEQUENZEN IN DEN PROTEINEN BESTIMMEN**

Der erste experimentelle Nachweis, daß Gene die Aminosäuresequenzen bestimmen, gelang beim Sichelzell-Hämoglobin. Das Wildtyp-Hämoglobinemolekül ist aus zwei verschiedenen Arten von Polypeptidketten aufgebaut: den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten. Jede Kette hat ein Molekulargewicht von ungefähr 16.100. Jedes Hämoglobinemolekül hat 2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Ketten, entsprechend einem Molekulargewicht von 64.500. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden von zwei verschiedenen Genen kontrolliert; eine einzelne Mutation wird daher entweder die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Kette betreffen, aber nie beide. Sichelzell-Hämoglobin unterscheidet sich von normalem Hämoglobin durch eine veränderte Aminosäure in der  $\beta$ -Kette. In Position 6 ist die Glutaminsäure des Wildtyp-Hämoglobins durch Valin ersetzt (Abbildung 8-8). Außer dieser einen Veränderung ist die gesamte Aminosäuresequenz in normalen und mutierten Peptiden des Hämoglobins identisch. Das zeigt, daß eine Mutation in einem Gen zu einer spezifischen Veränderung der Matrize für das Hämoglobin führt und legt sehr nahe, daß alle für die richtige Reihenfolge der Aminosäuren im Hämoglobin erforderlichen Informationen in den Genen gespeichert sind. Diese Vermutungen wurden stark durch Analysen der Aminosäuresequenzen einer Reihe pathologischer Hämoglobine unterstützt, die von Patienten, die an anderen Formen von Anämie litten, isoliert wurden. In diesen Fällen wies die Analyse der Aminosäuresequenzen nach, daß jede besondere Anämie durch den Austausch einer einzigen Aminosäure an einem bestimmten Platz innerhalb der Peptidketten des Hämoglobins charakterisiert ist.

Züchtungsexperimente mit Säugetieren können nicht im großen Maßstab durchgeführt werden; es ist daher unmöglich, die Veränderungen in den Hämoglobinsequenzen mit der Lokalisierung der entsprechenden Mutationen auf einer Genkarte zu korrelieren. Dies ist jedoch möglich, wenn man Enzymveränderungen bei Mikroorganismen untersucht, deren Genetik gut bekannt ist.

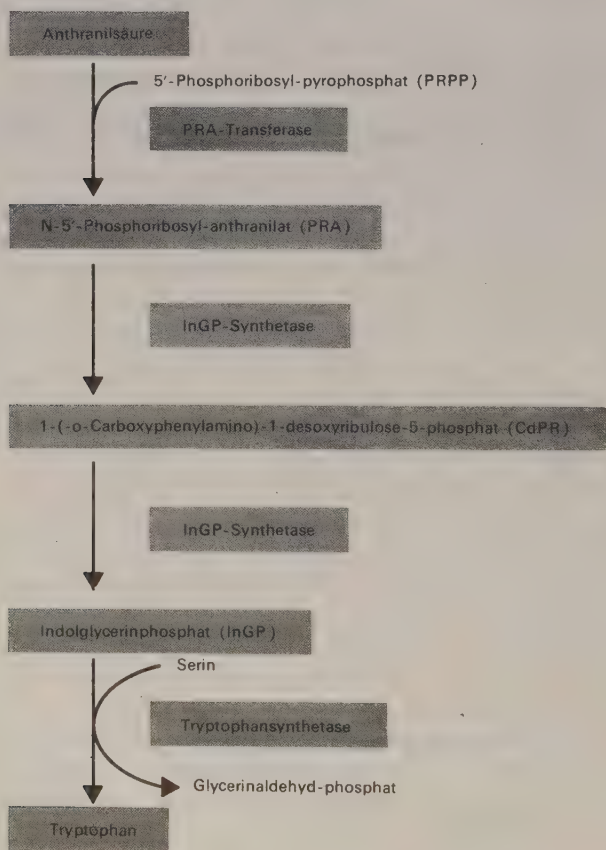
		Alpha Kette							
Position		1	2	16	30	57	58	68	141
Hb Variante		Val	Leu	- - - Lys <sup>+</sup>	- - - Glu <sup>-</sup>	- - - Gly	His <sup>+</sup>	- - - AspN <sup>-</sup>	- - Arg
Hb I				↓ Asp <sup>-</sup>					
Hb G Honolulu					↓ GluN				
Hb Norfolk						↓ Asp <sup>-</sup>			
Hb M Boston							↓ Tyr		
Hb G Philadelphia								↓ Lys <sup>+</sup>	

		Beta Kette									
Position		1	2	3	6	7	26	63	67	125	150
Hb Variante		Val	His <sup>+</sup>	Leu	- - Glu <sup>-</sup>	Glu <sup>-</sup>	- - Glu <sup>-</sup>	- - His <sup>+</sup>	- Val	- - Glu <sup>-</sup>	- - His <sup>+</sup>
Hb S				↓ Val							
Hb C				↓ Lys <sup>+</sup>							
Hb G San José					↓ Gly						
Hb E						↓ Lys <sup>+</sup>					
Hb M Saskatoon							↓ Tyr				
Hb Zürich							↓ Arg <sup>+</sup>				
Hb M Milwaukee-1								↓ Glu <sup>-</sup>			
Hb D β Punjab									↓ GluN		

**ABBILDUNG 8-8** Zusammenfassung der ausgetauschten Aminosäuren, die bisher bei menschlichem Hämoglobin bekannt sind.

**DAS GEN IST MIT SEINEM POLYPEPTIDPRODUKT KOLINEAR**

Für die Beziehung zwischen der Reihenfolge einzelner mutierbarer Plätze innerhalb eines Gens und der Reihenfolge der entsprechenden ausgetauschten Aminosäuren ist das Beispiel des *E. coli*-Enzyms Tryptophan-Synthetase am besten untersucht, eins von mehreren Enzymen, die an der Biosynthese des Tryptophans beteiligt sind (Abbildung 8-9). Dieses Enzym besteht aus zwei leicht voneinander zu trennenden Polypeptidketten A und B, von denen keine für sich allein eine enzymatische Aktivität besitzt. Eine große Anzahl von Mutanten, die kein Tryptophan mehr synthetisieren können, wurde isoliert; ihnen fehlt eine funktionsfähige A-Kette und sie sind daher enzymatisch inaktiv. Die genetische Analyse dieser Mutanten zeigte, daß Veränderungen an



**ABBILDUNG 8-9** Die letzten Schritte der Tryptophan-Biosynthese.



sehr vielen Mutationsorten zu inaktiven A-Ketten führen können. Eine genaue Kartierung dieser Mutanten zeigte, daß sie alle eindeutig auf der linearen Genkarte der Abbildung 8-10 lokalisiert werden können. Es war daher möglich, die inaktiven A-Ketten aus vielen dieser Mutanten zu isolieren und anzufangen, ihre Aminosäuresequenzen mit der der Wildtyp-A-Kette (mit 267 Aminosäuren) zu vergleichen. Die Sequenzuntersuchungen ermöglichen uns, zu sehen, wie der Ort einer Mutation in einem Gen mit dem Ort des Aminosäureaustausches im Polypeptidprodukt korreliert ist. Da sowohl Gene als auch Polypeptidketten linear sind, ist die einfachste Hypothese die, daß die ausgetauschten Aminosäuren in der gleichen Reihenfolge auftreten wie die Mutationsorte innerhalb eines Gens. Genau das konnte zur allgemeinen Freude im Jahre 1964 demonstriert werden. Der Platz jedes spezifischen Aminosäureaustausches ist mit einem Mutationsort auf der Genkarte genau korreliert (Kolinearität, Abbildung 8-10). Daher wird jede Aminosäure innerhalb einer Polypeptidkette durch einen spezifischen Bereich auf dem Gen kontrolliert (codiert).

#### **EINE MUTIERBARE STELLE KANN IN MEHREREN VERSCHIEDENEN FORMEN VORLIEGEN**

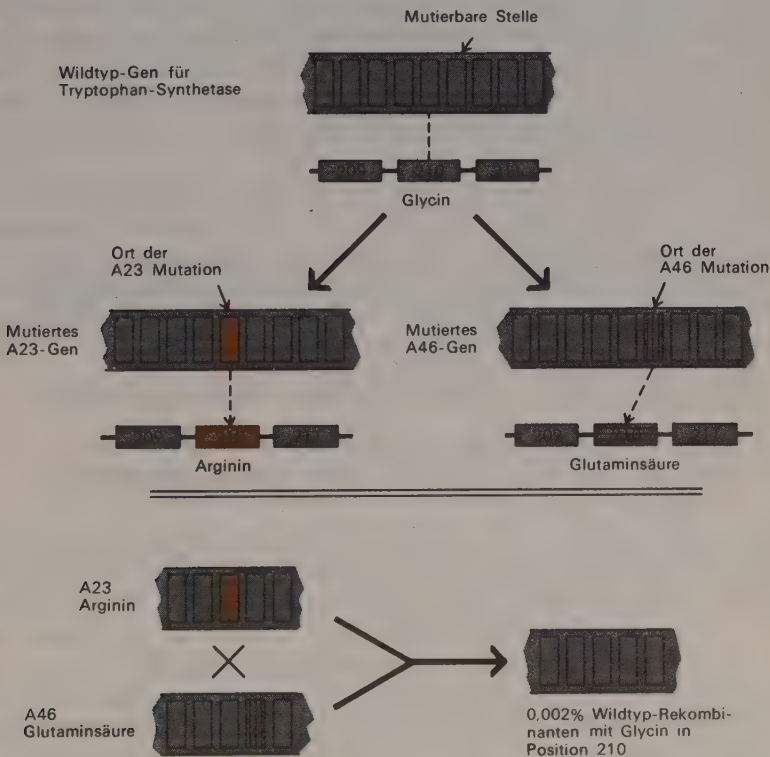
Enzymatisch inaktive Tryptophan-Synthetase-Moleküle, die durch Mutationen an *derselben* Stelle entstehen, weisen nicht immer den gleichen Aminosäureaustausch auf. Daß tatsächlich derselbe Mutationsort getroffen wurde, läßt sich dadurch nachweisen, daß es nicht gelingt, Rekombinanten vom Wildtyp herzustellen. Zum Beispiel kann eine Veränderung an einem und demselben Mutationsort zu einem Austausch des Glycins durch Glutaminsäure oder aber auch durch Valin führen, je nachdem welcher Stamm untersucht wurde. Das bedeutet, daß dieser Genort in mindestens drei verschiedenen Formen vorkommen kann. Im nächsten Kapitel werden wir Beweise diskutieren, aus denen hervorgeht, daß die mutierbaren Stellen die Desoxynukleotid-Bausteine sind, aus denen die Gene (DNA-Bereiche) aufgebaut sind. Da es nur vier verschiedene Desoxyribonukleotide gibt, können wir erwarten, daß genetische Befunde zeigen werden, daß eine mutierbare Stelle nie mehr als vier verschiedene Formen annehmen kann.

#### **EINZELNE AMINOSÄUREN WERDEN DURCH MEHRERE BENACHBARTE MUTIERBARE STELLEN BESTIMMT**

Es gibt keine Eins-zu-Eins-Beziehung zwischen mutierbaren Stellen und den davon abhängigen Aminosäuren. Genetische Befunde zeigen vielmehr, daß einige, wenn nicht sogar alle Aminosäuren durch einander benachbarte Stellen



gemeinsam bestimmt werden. Der entsprechende Beweis stammt aus einer Untersuchung der Position 210 des in Abbildung 8-10 dargestellten Fragments der Tryptophan-Synthetase. Die Behandlung des Wildstammes mit einem Mutagen hat zur Mutante A23 geführt, in der Glycin durch Arginin ersetzt wurde, und zur Mutante A46, in der das gleiche Glycin durch Glutaminsäure ersetzt ist. Der Unterschied zwischen A23 und A46 beruht nicht auf zwei verschiedenen Formen des gleichen Mutationsortes, da eine Kreuzung zwischen diesen beiden Mutanten zu Wildtyp-Rekombinanten mit Glycin in Position 210 führt (Abbildung 8-11). Beträfen die Veränderungen den gleichen Mutationsort, so könnte man nie Wildtyp-Rekombinanten erwarten. Die sehr geringe Häufigkeit, mit der Wildtyp-Rekombinanten gebildet werden, legt jedoch nahe, daß die betreffenden Mutationsorte sehr eng benachbart sind.



**ABBILDUNG 8-11** Beweis, daß eine einzelne Aminosäure durch mehr als eine mutierbare Stelle bestimmt wird. (Erläuterungen im Text).

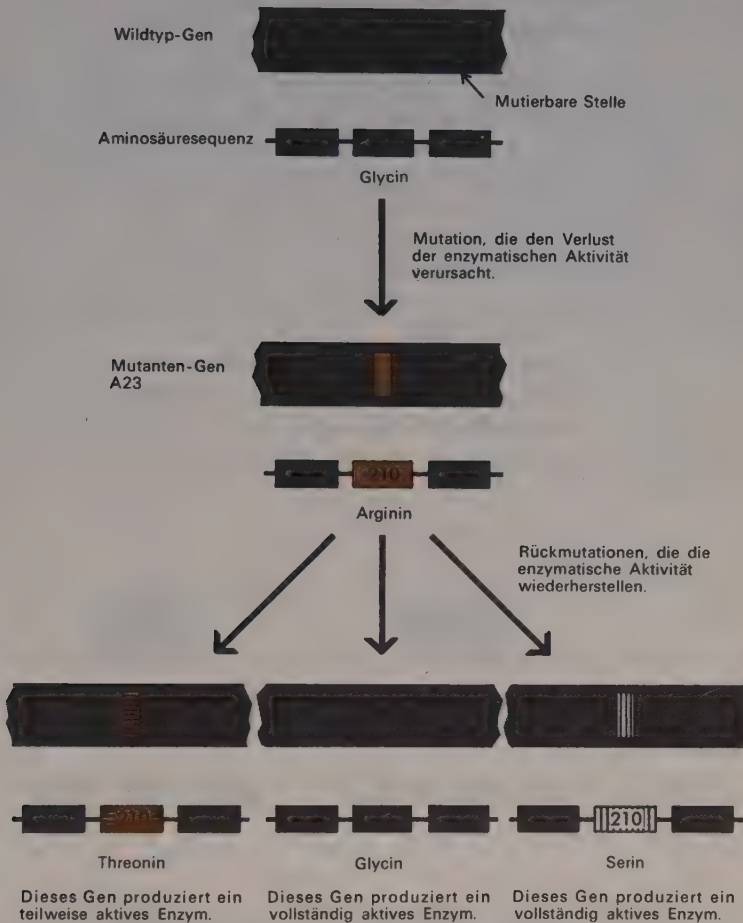
Andere Befunde, die zeigen, daß mehrere mutierbare Stellen innerhalb eines Gens eine einzige Aminosäure codieren, stammen aus der Untersuchung, wie die A23- und A46-Mutanten nach Behandlung mit Mutagenen weitermutieren. Nach Mutagenbehandlung können aus beiden Stämmen neue Stämme entstehen, die Tryptophan-Synthetase-Moleküle mit Glycin in Position 210 enthalten. Bei diesen Rückmutationen wird sehr wahrscheinlich der veränderte Mutationsort in die ursprüngliche Wildtyp-Form zurückverwandelt. Es entstehen jedoch auch Stämme, in denen die Aminosäure der Position 210 durch eine andere Aminosäure ersetzt wurde. Es ist besonders wichtig, daß die Austauschmöglichkeiten für die beiden Stämme A23 und A46 verschieden sind. Der Stamm A23 mutiert, neben der Rückmutation zu Glycin, zu Threonin und Serin, während A46 zusätzlich zu Alanin und Valin mutiert. Die Unfähigkeit von A23, je nach Alanin oder Valin zu mutieren, oder die von A46, je nach Threonin oder Serin zu mutieren, wäre sehr schwer zu erklären, wenn ihre Unterschiede vom Wildtyp auf verschiedenen Formen desselben Mutationsortes beruhten. Finden die Veränderungen aber an zwei verschiedenen Genorten statt, dann könnte ein Wechsel von Arginin nach Valin gleichzeitige Veränderungen an beiden Stellen erfordern und somit viel zu selten stattfinden, um bei normaler Mutagenbehandlung entdeckt zu werden.

Diese Experimente liefern nur die untere Grenze (nämlich zwei) für die Anzahl der mutierbaren Genplätze, die eine einzelne Aminosäure codieren. Viel ausführlichere Untersuchungen dieser Art wären erforderlich, um aufgrund dieser Versuche auch eine obere Grenze festzulegen. Im nächsten Kapitel wollen wir über andere Hinweise sprechen, aus denen hervorgeht, daß drei Mutationsorte (Nukleotide) eine gegebene Aminosäure codieren.

### **EINE GANZ BESTIMMTE, EINMALIGE AMINOSÄURESEQUENZ IST FÜR ENZYMATISCHE AKTIVITÄT NICHT ERFORDERLICH**

Soll eine Polypeptidkette enzymatisch wirksam sein, so ist dazu keine in allen Einzelheiten einmalige Aminosäuresequenz erforderlich. Dies zeigt eine Untersuchung der neuen Mutanten, die man durch Behandlung der Stämme A23 und A46 mit Mutagenen erhält. Die Tatsache, daß Glycin oder Serin in der Position 210 ein vollaktives Enzym ergibt (Abbildung 8-12), während Threonin in der gleichen Position zu einem Enzym mit reduzierter enzymatischer Aktivität führt, zeigt bereits, daß die Aktivität eines Enzyms keine in allen Einzelheiten streng festgelegte Aminosäuresequenz erfordert. Eine Reihe von Befunden zeigen in der Tat, daß ein Aminosäureaustausch in vielen Teilen der Polypeptidkette eintreten kann, ohne die katalytische Aktivität ernsthaft zu gefährden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß



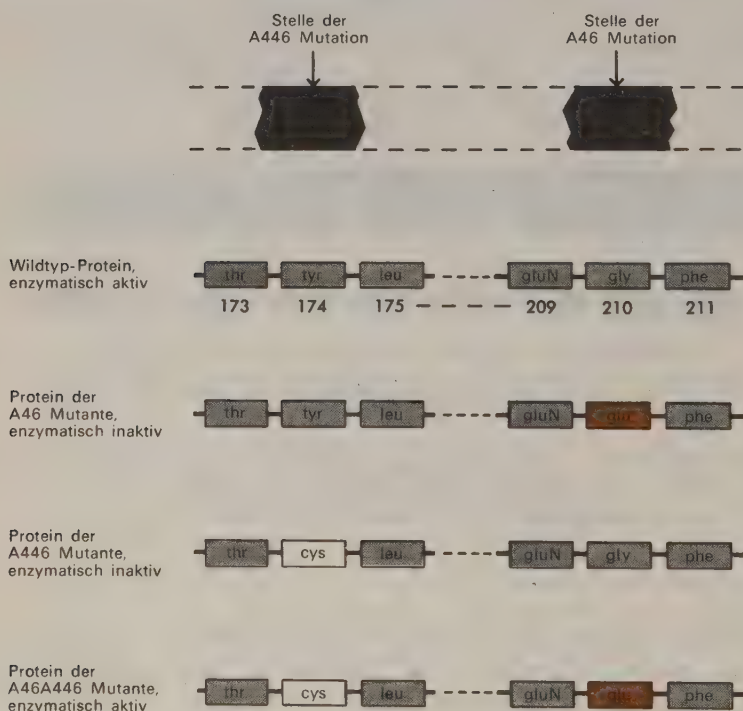


**ABBILDUNG 8-12** *Der Austausch einer Aminosäure führt nicht immer zum Verlust der Enzymaktivität (nähere Details im Text). Hier sind Mutationen, die an derselben mutierbaren Stelle stattfinden, willkürlich gezeigt.*

eine bestimmte Sequenz den besonderen Bedürfnissen einer Zelle am besten entspricht, und es ist gerade diese Sequenz, die von dem Wildtyp-Allel codiert wird. Auch wenn andere Sequenzen fast ebenso gut sind, werden sie doch im Laufe der Evolution durch Selektion eliminiert, es sei denn, sie wären genauso wirksam.

# SCHEINBARE RÜCKMUTATIONEN BEWIRKEN GELEGENTLICH EINEN ZWEITEN AMINOSÄUREAUSTAUSCH

Der Schluss, daß eine ganz bestimmte, einmalige Aminosäuresequenz keineswegs für die Enzymaktivität erforderlich ist, wird durch den Befund erweitert, daß bei einigen Mutationen, mit deren Hilfe ein inaktives Mutanten-Enzym in eine aktive Form zurückverwandelt wird, ein zweiter Austausch einer Aminosäure im Mutanten-Enzym stattgefunden hat. Wenn wir von Zellen der Mutante A46 ausgehen, die wegen des Ersatzes von Glycin durch Arginin eine inaktive Tryptophan-Synthetase produziert, so können an entfernten Genplätzen Mutationen auftreten, die gelegentlich wieder zu enzymatisch aktiven Enzymen führen. Eine solche Zweit-Mutation A446 liegt beispielsweise ein Zehntel einer Genlänge von der ersten entfernt (Abbildung 8-13). Die Doppelmutante A46A446 produziert aktive Proteinmoleküle mit zwei ausgetauschten Aminosäuren: das gegen Glycin ausgetauschte Arginin und ausserdem, 36 Aminosäuren weiter entfernt, gegen Tyrosin ausgetauschtes Cystein.



**ABBILDUNG 8-13** Rückwandlung (Suppression) des Phänotyps einer Mutante durch eine zweite Mutation an einer zweiten Stelle im gleichen Gen.

Die zweite Veränderung kann unabhängig von der ersten untersucht werden, wenn man Rekombinanten mit ausschließlich der A446-Mutation untersucht. Bemerkenswerterweise führt die A446 Mutation allein ebenfalls zu einem inaktiven Enzym. Wir sehen also, daß eine Kombination zweier falscher Aminosäuren ein Enzym mit einer aktiven 3-D-Struktur produzieren kann. Zwei falsche Aminosäuren kompensieren einander jedoch nur selten. So produzieren die Doppelmutanten A446/A23 und A446/A187 keine aktiven Enzyme. Es ist heute noch zu früh, darüber zu spekulieren, wie in diesem Enzym die Aminosäuren zur 3-D-Struktur gefaltet sind und warum nur einige Verbindungen wieder enzymatisch aktiv sind. Diese Art der Analyse muß warten, bis die 3-D-Struktur der Tryptophan-Synthetase bekannt ist.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Crossing-over kann innerhalb eines Gens stattfinden, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, Mutationen innerhalb eines Gens zu kartieren. Ebenso wie die Anordnung der Gene auf einem Chromosom, ist auch die Anordnung der mutierbaren Stellen in einem Gen strikt linear. Innerhalb eines durchschnittlichen Gens scheinen viele mutierbare Stellen (500-1500) zu liegen. Gelegentlich ist es zu Beginn genetischer Untersuchungen schwierig zu entscheiden, ob ein Chromosomenbezirk ein oder mehrere Gene enthält. Diese Frage kann meistens dadurch gelöst werden, daß mehr als ein mutiertes Chromosom (oder ein Chromosomenfragment), das die fragliche Region enthält, in eine Zelle eingeführt wird. Wenn zwei Mutanten einander ergänzen können, müssen ihre Mutationen in verschiedenen Genen liegen (Komplementationstest).*

*Gene bestimmen den Phänotyp einer Zelle, indem sie festlegen, welche Proteine die Zelle produzieren kann. Jedes Gen ist für die Synthese eines spezifischen Polypeptids verantwortlich. Gene kontrollieren die Aminosäuresequenzen in Proteinen. Dies wurde eindeutig dadurch nachgewiesen, daß viele Mutationen zur Produktion von Proteinen führen, die sich vom normalen Protein durch den Austausch einer einzigen Aminosäure unterscheiden. Mutierte Gene sind gewöhnlich gegenüber dem Wildtyp-Gen rezessiv, weil sie meistens nicht mehr in der Lage sind, das normale Protein zu produzieren. In solchen Heterozygoten dominiert das Wildtyp-Gen, indem es genügend Wildtyp-Produkte erzeugt, um den Wildtyp-Phänotyp hervorzurufen.*

*Es häufen sich gute Beweise daß das Gen und sein Polypeptidprodukt kolinear sind: Mutationen an einem Ende der Genkarte beeinflussen die Aminosäure am Ende der Polypeptidkette usw. Gene, die eine Reihe verwandter biochemischer Reaktionen kontrollieren, sind häufig auf den Chromosomen nebeneinander angeordnet. Verschiedene Mutanten der Tryptophan-Synthetase A zeigen, daß eine mutierbare Stelle in wenigsten drei verschiedenen Zuständen*

vorkommen kann (wir werden im nächsten Kapitel sehen, daß diese Zahl eigentlich vier sein müsste). Experimente mit diesen Mutanten zeigen außerdem, daß jede einzelne Aminosäure unter der gemeinsamen Kontrolle von mehr als einer mutierbaren Stelle steht (wir werden sehen, daß es drei sind) und daß ein Enzym nicht eine einmalige Aminosäuresequenz haben muß, um aktiv zu sein.

## LITERATUR

- Pontecorvo, G., *Trends in Genetic Analysis*, Columbia University Press, New York, 1958. Eine sehr lesbare Diskussion der Feinstrukturanalyse der Gene.
- Benzer, S., «The Fine Structure of the Gene», *Sci. Am.*, January 1962, S. 70-84. Eine deutliche Darstellung der klassischen Untersuchungen des rII-Gen des T4-Phagen.
- Hartman, P. E., und S. R. Suskind, *Gene Action*, 2. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Eine sehr klare Beschreibung der Funktionsweise von Genen; enthält viele der experimentellen Details, die zu allgemeinen Prinzipien geführt haben.
- Wagner, R. P., und H. K. Mitchell, *Genetics and Metabolism*, 2. Aufl., Wiley, New York, 1964. Ein fortgeschrittener Text, der eine Vielzahl verschiedener Gen-Enzym-Beziehungen darstellt.
- Ingram, V. M., *The Hemoglobins in Genetics and Evolution*, Columbia University Press, New York, 1963. Eine Beschreibung, auf welche Weisen Hämoglobin zur Aufklärung wichtiger biologischer Prinzipien führte. Für das vorliegende Kapitel ist besonders der Teil über die abnormen Hämoglobinmoleküle interessant.
- Yanofsky, C., «Gene Structure and Protein Structure», in R. H. Hynes und P. C. Hanawalt (Eds.), *The Molecular Basis of Life*, Freeman, San Francisco, 1968, S. 224-229. Eine einführende Beschreibung der klassischen Arbeiten des Autors über das Tryptophan-Synthetase-System.



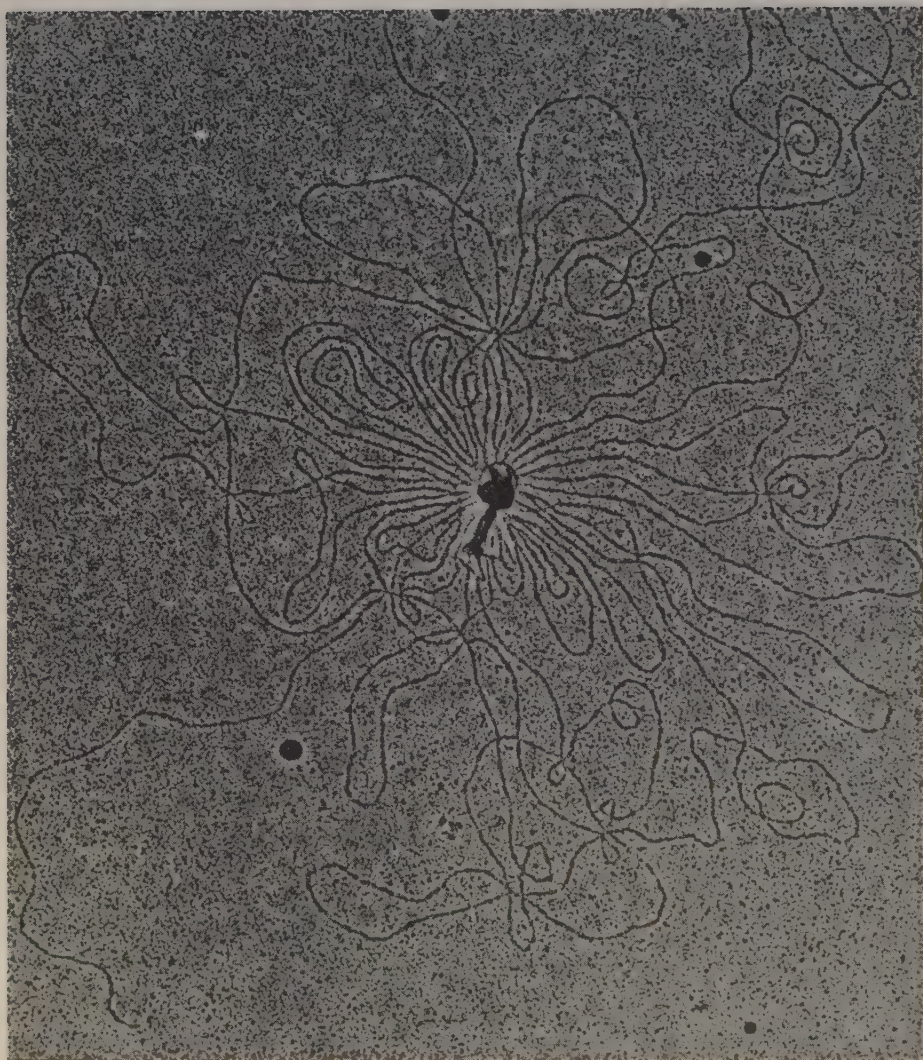
# 9

## DIE REPLIKATION DER DNA

Wir wissen aus der Genetik, daß die Information, welche die Aminosäuresequenzen in den Proteinen bestimmt, von langkettigen polymeren Molekülen, den Desoxyribonukleinsäuren (DNA) getragen wird.<sup>1</sup> Obwohl DNA schon vor ungefähr 70 Jahren in Chromosomen gefunden wurde, stellte man erst vor 20 Jahren eindeutig fest, daß sie eine genetische Funktion hat, und sogar dann dachten viele Genetiker noch, daß ein Teil der Information auch im Proteinbestandteil der Chromosomen enthalten sein könnte. Heute gibt es jedoch keinen Grund anzunehmen, daß irgendeine genetische Information in anderen Molekülen als in den Nukleinsäuremolekülen gespeichert wird.

Man muß nun fragen, wie die Information molekular weitergeleitet wird und zusätzlich, wie die DNA-Moleküle während der Verdoppelung der Chromosomen genau kopiert werden. Diese Fragen konnten 1943, als die genetische Rolle der DNA festgelegt wurde, nicht sofort in Angriff genommen werden. Zu dieser Zeit hatte man nur ein sehr fragmentarisches Wissen bezüglich ihrer Struktur. Man wußte, daß sie ein sehr langes, großes Molekül ist (Abbildung 9-1), aber das Ausmaß ihrer Komplexität war nicht genau bekannt. Daher bestand die große Befürchtung, daß die Struktur der DNA nicht nur von einem Gen zum anderen variieren würde, sondern

<sup>1</sup> Wie wir in Kapitel 15 sehen werden, enthalten die Chromosomen einiger Viren keine DNA, sondern setzen sich statt dessen aus der chemisch sehr ähnlichen Verbindung Ribonukleinsäure (RNA) zusammen.



**ABBILDUNG 9-1** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer T2 DNA  $\times 100\,000$ . [Reproduziert nach A. K. Kleinschmidt et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **61**, 857 (1962), mit Genehmigung.]

auch, daß die Auflösung ihrer Struktur sogar im einfachsten Fall fast unüberwindliche Probleme bieten würde. Darüber hinaus bestand die Befürchtung, daß wir, sogar wenn die Strukturen eines oder mehrerer DNA-Moleküle bekannt wären, keine eindeutigen Hinweise dafür bekämen, wie sie als

Matrize für ihre Selbstreplikation funktioniert und wie sie die Sequenz der Aminosäuren in Proteinen bestimmen könnte. Zum Glück erwiesen sich diese Befürchtungen als unbegründet. Nur zehn Jahre vergingen zwischen der Identifikation der DNA als der transformierenden Substanz und der 1953 erfolgten Aufklärung der doppelhelikalen Struktur der meisten DNA-Moleküle. Darüber hinaus waren die grundlegenden Charakteristika der Doppelhelix einfach und zeigten sofort wie DNA genetische Information speichert; besonders erfreulich war, daß sie auf einen chemischen Mechanismus für die Selbstreplikation der DNA hinwiesen. Von diesem Moment an trat die Arbeitsweise, in der Genetiker das Gen erforschten, in eine vollkommen neue Phase. Ihre Hypothesen brauchten nicht länger nur auf genetischen Kreuzungen zu basieren. Statt dessen war es vernünftig, sich immer zu fragen, welchen Einfluß die Struktur der DNA auf ihre genetischen Kreuzungen hatte. In der Folge wurden viele Gebiete (z.B. die Wirkungsweise der Mutagene), die früher einer systematischen Behandlung Widerstand leisteten, einer rationalen Analyse eröffnet.

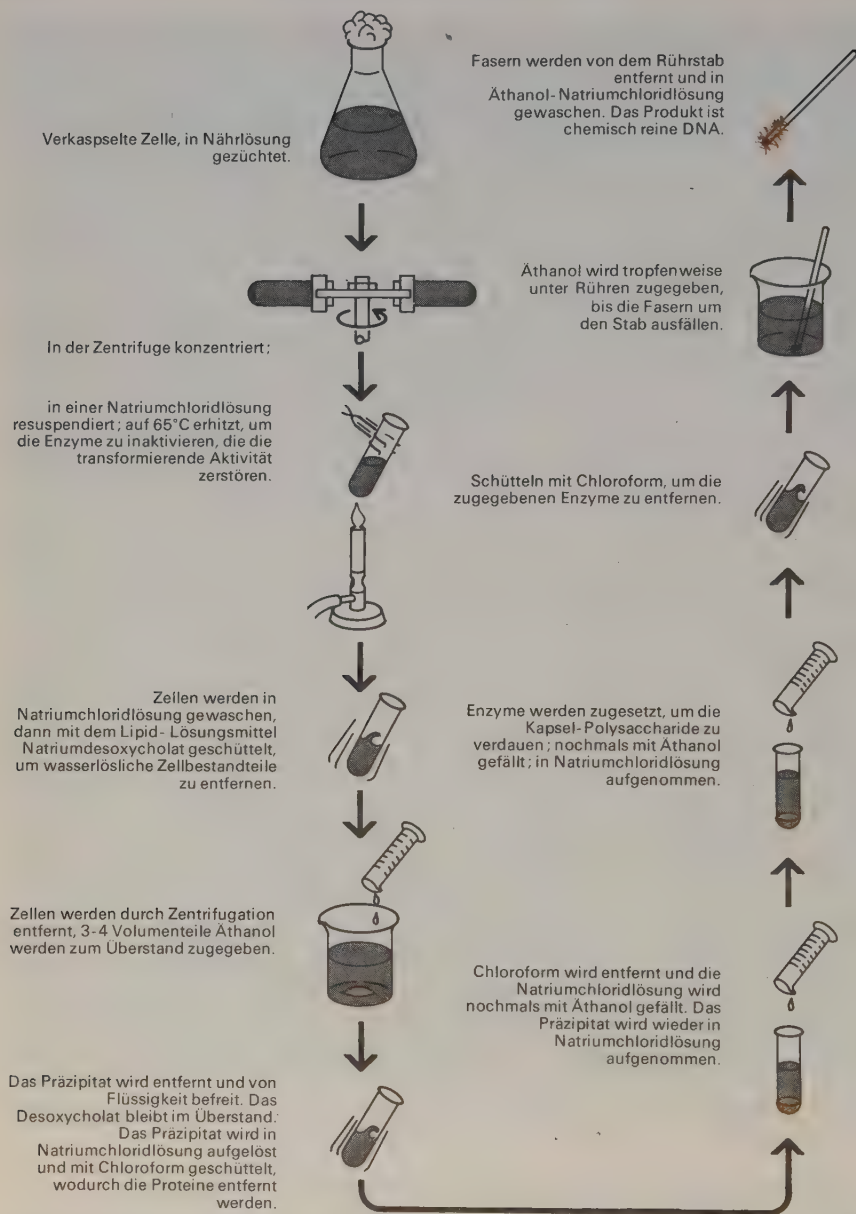
#### **DAS GEN BESTEHT (FAST IMMER) AUS DNA**

Zum ersten Mal wurde der DNA eine primäre genetische Rolle aufgrund von Versuchen zugeschrieben (im Kapitel 7 besprochen), die sich mit der genetischen Transformation von Pneumokokken beschäftigten. Kurz nach der Entdeckung, daß Zellextrakte Transformationen bewirken, wurden sorgfältige chemische Studien begonnen, um festzustellen, welche Art von Molekülen verantwortlich wäre. Da praktisch jeder glaubte, daß Gene Proteine wären, war man anfänglich sehr überrascht, als Avery und seine Mitarbeiter 1943 veröffentlichten, daß das aktive genetische Prinzip Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist (Abbildung 9-2). Ein wichtiges experimentelles Ergebnis, das zu dieser Schlußfolgerung führte, war die Beobachtung, daß das transformierende Prinzip des Extrakts durch Desoxyribonuklease zerstört wird, ein Enzym, das DNA-Moleküle spezifisch in ihre Nukleotidbausteine spaltet und das keine Wirkung auf die Integrität der Proteinmoleküle oder der Ribonukleinsäure (RNA) hat. Weder die Zugabe des Enzyms Ribonuklease (das RNA abbaut) noch die verschiedener proteolytischer (Protein-zerstörender) Enzyme hatte einen Einfluß auf die transformierende Aktivität.

#### **DIE MENGE DER DNA IN CHROMOSOMEN IST KONSTANT**

Obwohl die Transformationsresultate klar waren, war man anfänglich bezüglich ihrer allgemeinen Anwendbarkeit skeptisch; man bezweifelte, ob sie für etwas anderes als nur für gewisse Bakterienstämme zutreffen würden.





**ABBILDUNG 9-2** Die bei der ursprünglichen Isolierung eines chemisch reinen, transformierenden Agens angewandte chemische Methode. (Nach F. W. Stahl, *The Mechanics of Inheritance*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964, Abbildung 2.3, mit Genehmigung.)



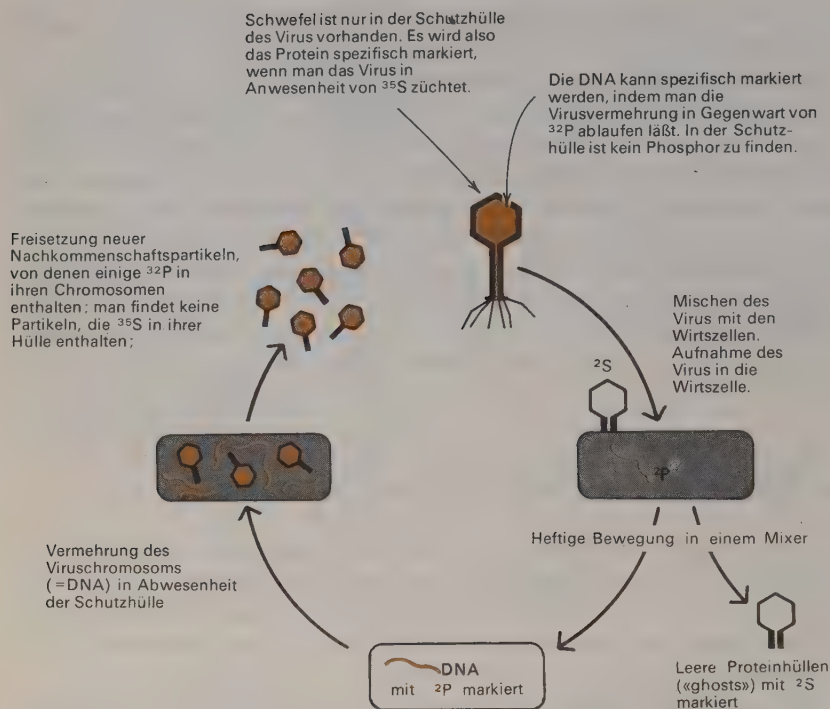
So wurde die ungeheure Bedeutung von Avery's Entdeckung nur langsam richtig eingeschätzt.

Eine wichtige Bestätigung erfolgte durch die Erforschung der chemischen Natur der Chromosomen. Man fand, daß DNA ihren Sitz fast ausschließlich im Kern hat und so gut wie nie dort, wo keine Chromosomen zu erkennen sind. Außerdem war die Menge der DNA pro diploidem Chromosomensatz für einen gegebenen Organismus konstant und entsprach der doppelten Menge in den haploiden Geschlechtszellen. Daß DNA ein genetisches Molekül ist, wurde auch durch die Beobachtung bewiesen, daß sie metabolisch stabil ist. Sie wird nicht, wie viele andere Zellmoleküle, schnell aufgebaut und zerstört; wenn Atome einmal in DNA inkorporiert sind, dann verlassen sie sie nicht mehr, so lange ein gesundes Zellwachstum aufrecht erhalten bleibt.

#### **VIRALE GENE BESTEHEN AUCH AUS NUKLEINSÄUREN**

Eine noch wichtigere Bestätigung für die genetische Rolle der DNA kam von chemischen Untersuchungen an Viren und Virus-infizierten Zellen. 1950 war es bereits möglich, eine Anzahl von praktisch reinen Viren zu erhalten und zu bestimmen, welche Arten von Molekülen in ihnen vorhanden waren. Diese Arbeiten führten zu der sehr wichtigen Verallgemeinerung, daß alle Viren Nukleinsäure enthalten. Da man zu dieser Zeit zunehmend erkannte, daß Viren genetisches Material enthalten, erhob sich sofort die Frage, ob die Nukleinsäure-Komponente das Viruschromosom darstellt. Die erste entscheidende experimentelle Überprüfung dieser Frage ergab sich aus Isotopen-Untersuchungen der Vermehrung von T2, eines Virus, das einen DNA-Kern und eine Schutzhülle enthält, die durch Aggregation einer Anzahl verschiedener Proteinmoleküle aufgebaut wird. In diesen Experimenten wurde die Proteinhülle mit dem radioaktiven Isotop  $^{35}\text{S}$  und die DNA mit dem radioaktiven Isotop  $^{32}\text{P}$  markiert. Das markierte Virus wurde dann verwendet, um das Schicksal des Phagenproteins und der Nukleinsäure im Verlauf der Virusvermehrung zu verfolgen, besonders um zu sehen, welche markierten Atome des parentalen Virus in der Virusnachkommenschaft auftraten.

Diese Experimente ergaben klare Resultate (Abbildung 9-3): In der Phagennachkommenschaft wurde ein Großteil der parentalen Nukleinsäure, aber kein parentales Protein entdeckt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nur ein geringer Teil des parentalen Proteins je in die Bakterien eindringt, sondern daß es ausübt an der Außenseite der Bakterienzelle bleibt und keine Funktion ausübt nachdem der DNA Bestandteil eingedrungen ist. Dieser Punkt wurde deutlich bewiesen, indem man infizierte Bakterien nach dem Eintritt von DNA heftig schüttelte: Die Proteinhüllen wurden abgeschüttelt.



**ABBILDUNG 9-3** Beweis, daß nur die DNA Komponente von T2 genetische Information trägt und daß die Proteinhülle schützend wirkt, was den DNA Transfer zu neuen Wirtszellen erleichtert.

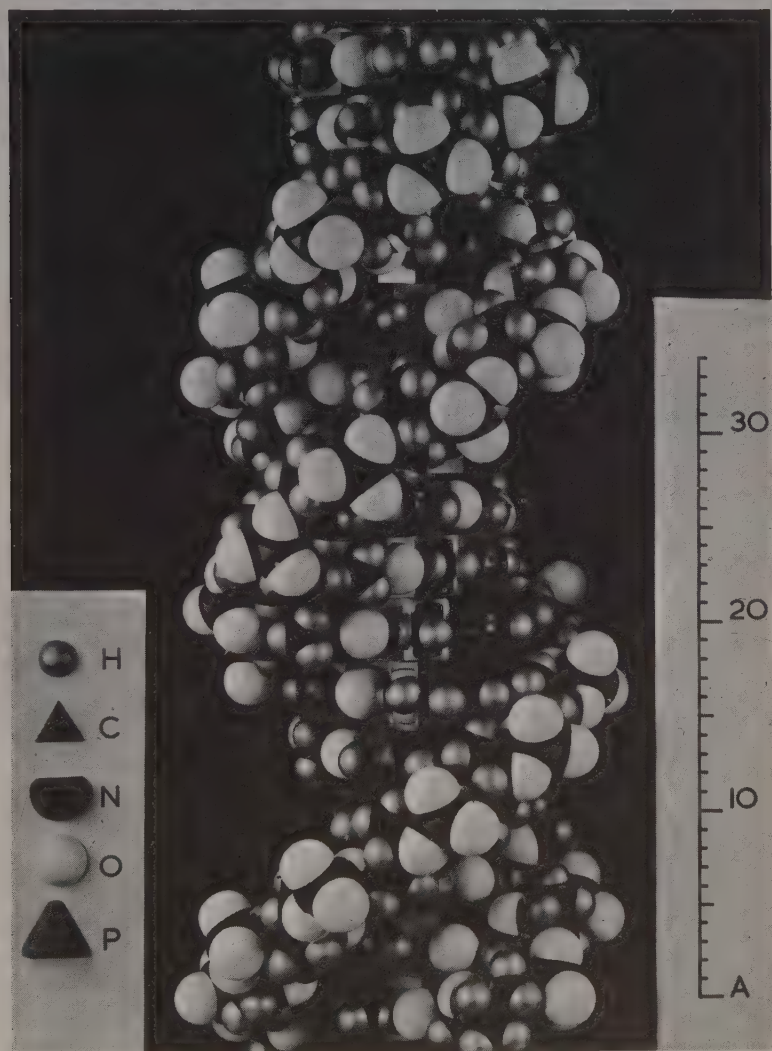
ohne daß die Fähigkeit der Bakterien, neue Viruspartikeln zu bilden, beeinträchtigt wurde.

Mit einigen Viren kann man heutzutage noch überzeugendere Versuche durchführen: Zum Beispiel kann reine DNA des Mäusevirus Polyoma in Mäusezellen eindringen und einen Zyklus der Virusvermehrung in Gang setzen, wobei viele Tausende neuer Polyomapartikeln hergestellt werden. Die primäre Funktion des Virusproteins besteht also darin, seine genetische Nukleinsäurekomponente während ihrer Wanderung von einer Zelle zur anderen zu schützen. Es besteht somit kein Grund, den Proteinmolekülen irgendeine genetische Rolle zuzuweisen.

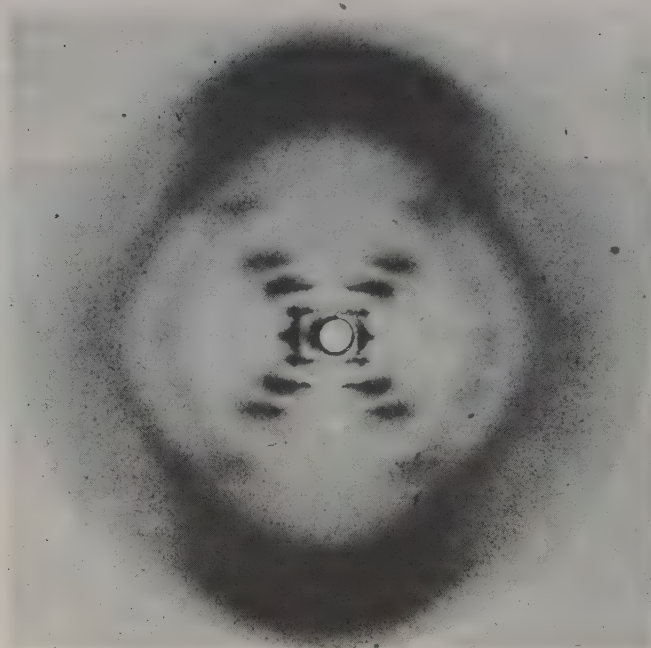
## DNA IST NORMALERWEISE EINE DOPPELHELIX

Das wichtigste Merkmal der DNA ist, daß sie normalerweise aus zwei sehr langen, dünnen polymeren Ketten besteht, die in Form einer regel-

mäßigen Doppelhelix unmeinander gewunden sind (Abbildung 9-4 und 9-5). Der Durchmesser der Helix ist ungefähr 20 Å und jede Kette führt alle 34 Å eine komplette Windung aus, Jede Kette ist ein Polynukleotid (Abbildung 3-10), eine regelmäßige polymere Ansammlung von Nukleotiden



**ABBILDUNG 9-4** Ein raumfüllendes Modell der doppelhelikalen DNA. Die Größe der Kugeln spiegelt die van der Waals-Radien der verschiedenen Atome wider. (Mit freundlicher Genehmigung von M. H. F. Wilkins.)



**ABBILDUNG 9-5** Die Röntgenaufnahme, die bei der Aufklärung der DNA eine entscheidende Rolle spielte. Dieses Photo, das im King's College, London, im Winter 1952-1953 von Rosalind Franklin aufgenommen wurde, bestätigte die damals gängigen Vermutungen, daß die DNA helikal war. Die helikale Form wird durch das kreuzweise Muster der Röntgenstrahlenreflexe (photographisch durch Schwärzung des Röntgenfilms gemessen) im Mittelpunkt der Aufnahme angezeigt. Die besonders dunklen Bereiche oben und unten zeigen an, daß die 3,4-Å dicken Purin- und Pyrimidinbasen regelmäßig nebeneinander aufgeschichtet sind, vertikal zur Helixachse. [Wiedergegeben nach R. E. Franklin und R. Gosling. *Nature*, 171, 740 (1953), mit Genehmigung.]

in denen der Zucker jedes Nukleotids durch eine Phosphatgruppe mit dem Zucker des benachbarten Nukleotids verbunden ist. An jeder Windung der Helix sind 10 Nukleotide von jeder Kette beteiligt. Die Entfernung zwischen Nukleotidbasen ist daher 3,4 Å. Es gibt vier hauptsächliche Nukleotide, von denen jedes einen Desoxyriboserest, eine Phosphatgruppe und eine Purin- oder Pyrimidinbase enthält (Abbildung 3-9). Es gibt zwei Pyrimidine, Thymin (T) und Cytosin (C), und zwei Purine, Adenin (A) und Guanin (G). In der Polynukleotidkette sind bei der Verbindung von Zucker- und Phosphatgruppen immer die gleichen chemischen Gruppen beteiligt. Daher ist dieser Teil des Moleküls, der das Skelett genannt wird, sehr regelmäßig. Im Gegensatz dazu ist die Folge der Purin- und Pyrimidinreste entlang

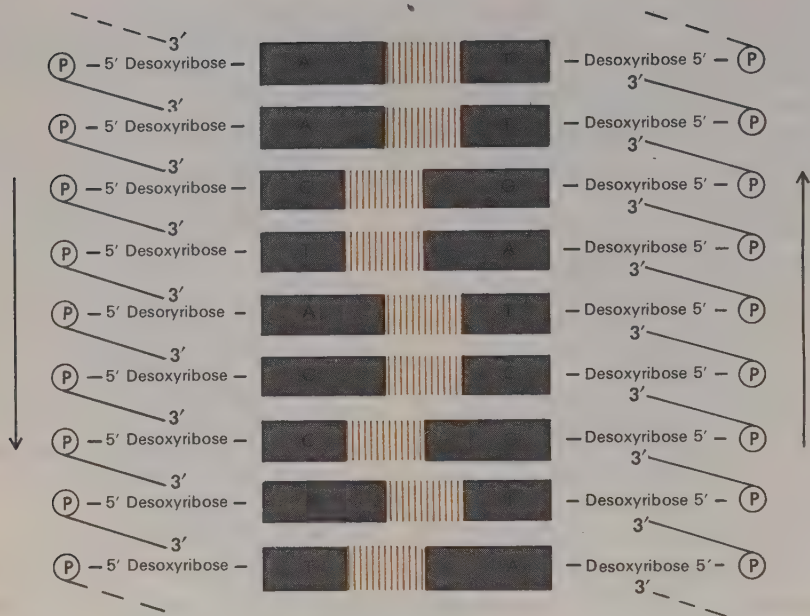


der Kette höchst unregelmäßig und variiert von Molekül zu Molekül. Sowohl die Purin- als auch die Pyrimidinbasen sind flache, relativ wasserunlösliche Moleküle, die dazu neigen, sich übereinander vertikal zur Richtung der Helixachse aufzustapeln.

Die beiden Ketten werden durch Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Basenpaaren zusammengehalten. Adenin ist immer mit Thymin und Guanin immer mit Cytosin gepaart (Abbildung 4-14). Nur diese Anordnungen sind möglich, da zwei Purine zu viel Platz in Anspruch nehmen würden, um eine regelmäßige Helix zu ermöglichen und entsprechend würden zwei Pyrimidine zu wenig Platz brauchen. Die Strenge dieser Paarungsregeln führt zu einer komplementären Beziehung zwischen den Basensequenzen auf den zwei umeinander verschlungenen Ketten. Wenn wir zum Beispiel eine Sequenz ATGTC auf einer Kette haben, muß die gegenüberliegende Kette die Sequenz TACAG haben. Die stereochemische Folge der Bildung von  $A \cdots T$  und  $G \cdots C$  Basenpaaren ist, daß die zwei Polynukleotidketten in entgegengesetzten Richtungen verlaufen. Wenn man die Helix um  $180^\circ$  dreht, sieht sie daher, oberflächlich betrachtet, gleich aus (Abbildung 9-6).

Eine wichtige chemische Eigenschaft der Struktur ist die Position des Wasserstoffatoms in den Purin- und Pyrimidinbasen. Vor 1953 wurde vielfach angenommen, daß einige der Wasserstoffatome sehr beweglich wären und sich willkürlich von einem Ringstickstoff- oder Sauerstoffatom zu einem anderen bewegten und daß man ihnen daher keine feste Position zuordnen könnte. Jetzt wissen wir, daß, obwohl diese Bewegungen (sogenannte tautomere Umlagerungen) stattfinden, sie im allgemeinen sehr selten sind und die H Atome meistens an genau festgelegten Orten gefunden werden. Die N Atome, die mit den Purin- und Pyrimidinringen verbunden sind, liegen für gewöhnlich in der *Amino* ( $NH_2$ ) Form und nur äußerst selten in der *Imino* (NH) Form vor. Ebenso haben die Sauerstoffatome, die mit den C-6 Atomen von Guanin und Thymin verbunden sind, normalerweise Ketoform ( $C=O$ ) und nehmen nur selten die Enolform (COH) an. Wie wir später sehen werden, sind diese relativ stabilen Positionen essentiell für die biologische Funktion der DNA, denn wenn H Atome keine festgelegte Position hätten, könnte sich Adenin oft mit Cytosin und Guanin mit Thymin paaren.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen von A/T und G/C, die immer 1-1 sein müssen, um die Basenpaarungsgesetze zu erfüllen, gibt es große Schwankungen im  $A + T/G + C$  Gehalt zwischen den verschiedenen DNA-Molekülen (Tabelle 9-1). Höhere Pflanzen und Tiere haben alle einen Überschuß von A + T über G + C in ihrer DNA, während unter den Viren, Bakterien und niederen Pflanzen große Unterschiede bestehen und sowohl A + T-reiche als auch G + C-reiche Arten auftreten. Diese Variationen sind jedoch nicht rein willkürlich und die Basenverhältnisse taxonomisch verwandter Organis-



**ABBILDUNG 9-6** Schema der DNA Doppelhelix, das die spezifische Basenpaarung, die unbegrenzte Sequenz von Basen entlang jeder Kette und die umgekehrte Richtung der 3'-5'-Phosphodiesterbindungen der zwei Ketten zeigt. Die starken Linien deuten die Basen an und die unterbrochenen Linien die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Basenpaaren (A, Adenin; G, Guanin; T, Thymin; C, Cytosin). (Gezeichnet nach W. Hayes, *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*, Blackwell, Oxford, 1964, S. 229, mit Genehmigung).

men sind sehr ähnlich. Bis jetzt ist der Grund für diese große Streuung der Basenverhältnisse noch nicht bekannt. Sie könnte eine Folge der intensiven Evolution, aber sicherlich keine Voraussetzung dafür sein. Man beachte die ungeheueren Unterschiede zwischen höheren Pflanzen und Tieren trotz ungefähr ähnlicher Prozentsätze der vier hauptsächlichen Basen. Diese Tatsache lehrt uns, daß die Variation in der Sequenz der Basen alleine genügt, um die Unterschiede in den Genen der Pflanzen und Tiere hervorzubringen.

DNA Moleküle, die reich an G + C sind, sind thermisch stabiler als A + T-reiche Moleküle. Wenn doppelhelikale DNA-Moleküle über physiologische Temperaturen (nahe 100°C) erhitzt werden, gehen ihre Wasserstoff-Brückenbindungen auf und die Komplementärstränge trennen sich oft voneinander (DNA-Denaturierung). Da das G...C Basenpaar durch drei Wasserstoff-Brückenbindungen zusammengehalten wird, sind höhere Temperaturen notwendig, um G + C-reiche Stränge zu separieren, als um A + T-reiche Moleküle zu trennen.

**TABELLE 9-1** Beispiele für die Streuung der A+T/G+C Verhältnisse in den DNA-Molekülen taxonomisch unterschiedlicher Organismen.

Herkunft der DNA	$\frac{A+T}{G+C}$	Herkunft der DNA	$\frac{A+T}{G+C}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Bakterium)	0,51	<i>Paracentrotus lividus</i> (Seeigel)	1,86
<i>Escherichia coli</i>	0,97	<i>Locusta migratoria</i> (Insekt)	1,41
<i>Bacillus megaterium</i> (Bakterium)	1,66	Forelle	1,34
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Bakterium)	0,60	Haushuhn	1,36
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)	1,80	Pferd	1,33
<i>Aspergillus niger</i> (Pilz)	1,00	Mensch	1,40
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Alge)	0,57	Phage T2	1,84
<i>Rhabdonema adriaticum</i> (Alge=Kieselalge)	1,71	Phage $\lambda$	1,06
Weizen	1,22		

Die Denaturierung ist nicht unbedingt ein irreversibles Phänomen. Wenn eine erhitzte DNA Lösung langsam abgekühlt wird, kann oft ein einzelner Strang seinen Komplementärstrang treffen und wieder ein regelmäßiges doppelhelikales Molekül bilden. Aufgrund dieser Fähigkeit, DNA-Moleküle zu renaturieren, kann man zeigen, daß durch langsames Abkühlen von Gemischen denaturierter DNA zweier verschiedener Spezies künstliche hybride DNA-Moleküle gebildet werden können. Es können zum Beispiel hybride Moleküle gebildet werden, die einen Strang von einem Menschen und einen von einer Maus enthalten. Nur ein Bruchteil (25 Prozent) der DNA-Stränge des Menschen kann Hybriden mit Mäuse-DNA bilden. Das ist natürlich nicht überraschend, da es nur bedeutet, daß einige Gene des Menschen denen der Maus sehr ähnlich sind, während andere ganz verschiedene Nukleotidsequenzen haben. Diese molekulare Methode scheint bei der Feststellung genetischer Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen taxonomischen Gruppen sehr nützlich zu sein.

#### DIE KOMPLEMENTÄRE GESTALT WEIST SOFORT AUF SELBSTREPLIKATION HIN

Bei der Besprechung, wie Matrizen wirken müssen, wurde schon betont, daß sich im allgemeinen zwei identische Oberflächen nicht anziehen und

daß es statt dessen leichter ist, sich die Anziehung entgegengesetzt geformter und geladener Gruppen vorzustellen. Daher könnte man ohne detailliertes strukturelles Wissen annehmen, daß ein Molekül, das so kompliziert wie das Gen ist, nicht direkt kopiert werden könnte. Statt dessen würde die Replikation zur Bildung eines Moleküls führen, dessen Gestalt genau komplementär ist und dieses würde wiederum als Matrize dienen, um ein Ebenbild der ursprünglichen Matrize herzustellen. Als noch detaillierte Kenntnisse der Struktur von Proteinen oder Nukleinsäuren fehlten, fragten sich einige Genetiker, ob DNA als Matrize für ein spezifisches Protein dienen könnte, das seinerseits wiederum die Matrize für ein entsprechendes DNA-Molekül wäre.

Die Erkenntnis, daß es möglich ist, ein DNA-Molekül zu bilden, in dem die spezifischen genetischen Oberflächen (die Purin- und Pyrimidinbasen) der zwei Polynukleotidstränge in Form und Ladung komplementär sind, führt uns unmittelbar dazu, die Möglichkeit zu verwerfen, die wir schon für chemisch schwierig, wenn nicht sogar unmöglich hielten, nämlich, daß die Bildung spezifischer Proteine der wesentliche Aspekt der DNA-Replikation ist. Statt dessen ist es wesentlicheinfacher, sich vorzustellen, daß die DNA-Replikation über die Trennung der Stränge und die Bildung komplementärer Moleküle auf jedem freien einzelnen Strang abläuft (Abbildung 9-7). Nach diesem Schema würde jeder der beiden Stränge jedes DNA-Moleküls als Matrize für die Bildung seines komplementären Stranges dienen.

Aus der Notwendigkeit, die Wasserstoff-Brückenbindungen zu spalten, die die Basenpaare in den parentalen Matrizen verbinden, ergibt sich keine Schwierigkeit. Obwohl sie höchst spezifisch sind, sind sie gleichzeitig relativ schwach und es werden keine Enzyme benötigt, um sie zu bilden oder zu spalten. Sie sind daher das ideale Mittel, eine Matrize und ihr komplementäres Ebenbild spezifisch zusammenzuhalten. Auch die Notwendigkeit, das DNA-Molekül zu entwinden, um die beiden verschlungenen Stränge zu trennen, erweist sich nicht als wirkliches Problem. Das DNA-Molekül ist sehr dünn (20 Å), und eine Drehung um die Achse erfordert fast keine Energie.

## **DIE BASENPAARUNG SOLLTE EINE SEHR GENAUE REPLIKATION ERLAUBEN**

Es wurde schon gesagt, daß die Chemie der spezifischen Aminosäure-Seitenketten gegen ihre Verwendung als genaue Matrize sprach. Genau das Gegenteil trifft jedoch für die Purin- und Pyrimidinbasen zu, denn jede von ihnen kann einige Wasserstoffbrücken bilden. Diese Bindungen sind ideale Matrizenkräfte, denn sie sind viel spezifischer als die van der Waals-Wechselwir-



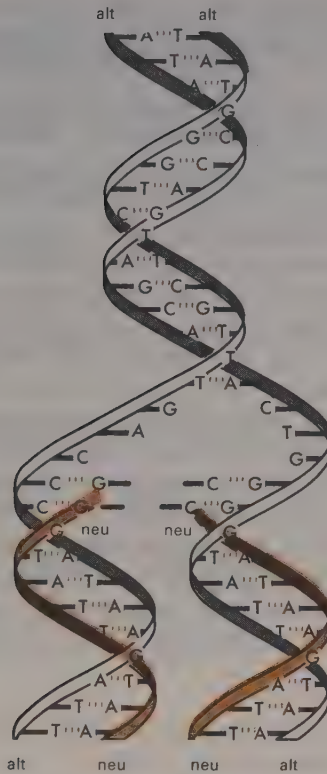


ABBILDUNG 9-7 Die Replikation der DNA.

kungen, deren Anziehungskräfte sowohl schwächer als auch praktisch unabhängig von spezifischen chemischen Gruppierungen sind.

Die durchschnittliche Energie einer Wasserstoff-Brückenbindung ist ungefähr 4 kcal/Mol oder das Achtfache der durchschnittlichen Energie der thermischen Bewegung von Molekülen bei Zimmertemperatur. Dieser Wert erlaubt uns, das Verhältnis der Häufigkeit, mit der sich zwei geeignete Gruppen durch Wasserstoffbrücken verbinden, gegenüber der Häufigkeit der Nichtbindung abzuschätzen. Unter normalen zellulären Bedingungen ist das Verhältnis von Bindung zu Nichtbindung  $10^4$ . Dies bedeutet, daß zwei durch einige Wasserstoff-Brückenbindungen zusammengehaltene Moleküle fast nie in der nichtgebundenen Form angetroffen werden. Zum Beispiel ist die Häufigkeit, mit der sich während der DNA-Replikation Adenin an Cytosin bindet, um einen Faktor von ungefähr  $10^{-8}$  geringer als seine Bindungen mit Thymin ( $10^{-4} \times 10^{-4}$ , da zwei Wasserstoff-Brücken-

bindungen beteiligt sind). Da das G····C Paar durch drei Wasserstoff-Brückenbindungen zusammengehalten wird, sollte die Replikation sogar noch genauer sein.

Dieses Argument wird von der Tatsache, daß die Basen mit den Wasserstoff- und Sauerstoffatomen des Wassers fast genauso starke Bindungen eingehen können, nicht betroffen. Es macht nichts aus, wenn zum Beispiel die potentielle Thymin-Position zeitweilig mit einigen Wassermolekülen ausgefüllt ist. Sie können sich chemisch nicht mit der wachsenden Polynukleotidkette verbinden und sie werden bald wegdiffundieren und durch das geeignete Wasserstoffbrücken-bindende Nukleotid ersetzt werden.

Es ist bis jetzt noch nicht möglich, ein ähnliches quantitatives Argument anzuführen, warum sich zwei Purine oder zwei Pyrimidine niemals irrtümlich aneinander binden. Beide Anordnungen führen zwar zu einer erheblichen Verzerrung des Zucker-Phosphat-Skeletts und sind energetisch ausgesprochen ungünstig, aber die große Anzahl der beteiligten Atome macht die genaue Berechnung der Energieunterschiede derzeit unmöglich. Ein Teil der Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß die genauen Positionen der Atome in DNA nicht auf 0,1 Å genau bekannt sind. Außerdem ist unklar, welche Auswirkung diese Verzerrung auf die Bindung des Enzyms hätte, das die Bildung der kovalenten Bindungen zwischen den Nukleotiden katalysiert.

## **DIE DNA ENTHÄLT DIE GESAMTE SPEZIFITÄT, DIE FÜR IHRE SELBSTREPLIKATION ERFORDERLICH IST**

Der Beweis für diese Behauptung stammt aus der Entdeckung im Jahre 1956, daß die DNA-Synthese in einem zellfreien System aus *E. coli* Zellen beobachtet werden konnte. Das fragliche Enzym, DNA-Polymerase, war das erste, von dem bekannt wurde, daß es bei der Synthese von Polydesoxynukleotiden beteiligt ist. Es knüpft die Nukleotidvorstufen durch Phosphodiesterbindungen von 3' nach 5' (Abbildung 9-8). Außerdem wirkt es nur in Anwesenheit von DNA, die benötigt wird, um die vier Nukleotide in dem Polynukleotidprodukt richtig anzuordnen.

Die DNA-Polymerase selbst erkennt nur den immer wiederkehrenden Zucker-Phosphat-Teil der Nukleotidvorstufen und kann deshalb die Sequenzspezifität nicht bestimmen. Das kann eindeutig gezeigt werden, wenn man das Enzym in Anwesenheit von DNA-Molekülen arbeiten läßt, die verschiedene Mengen von A····T und G····C Basenpaaren enthalten. In jedem Fall hat das enzymatisch synthetisierte Produkt das Basenverhältnis der ursprünglichen DNA (Primer DNA) (Tabelle 9-2). Während dieser zellfreien Synthese findet keine Synthese von Protein oder irgendeiner anderen Klasse

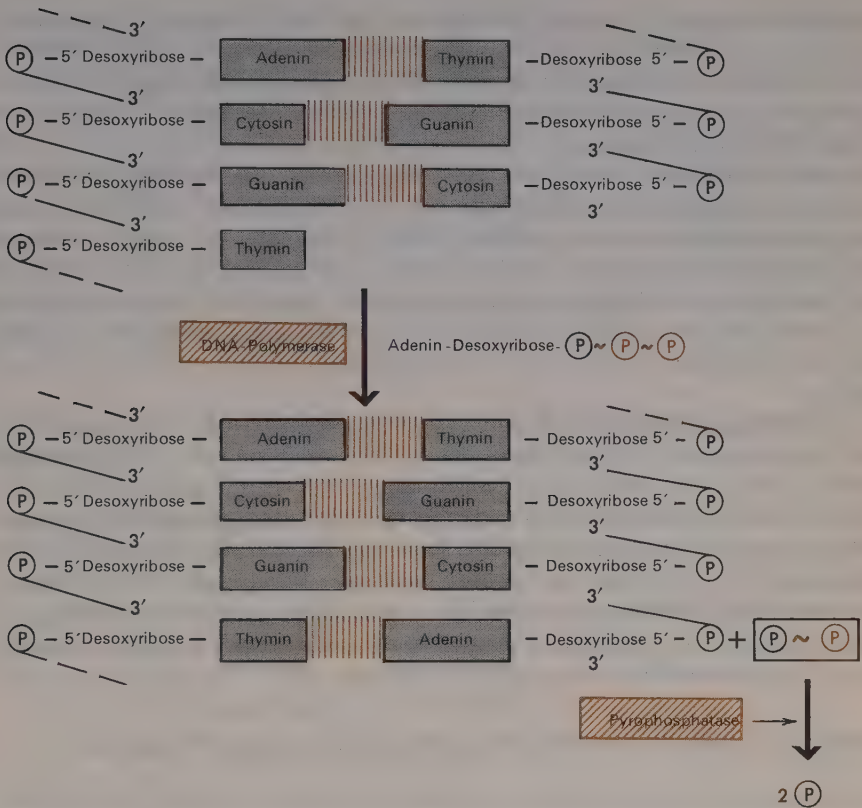


ABBILDUNG 9-8 Enzymatische Synthese einer DNA-Kette, katalisiert durch DNA-Polymerase.

TABELLE 9-2. Ein Vergleich der Basenzusammensetzung von enzymatisch synthetisierter DNA und ihrer DNA-Matrizen.

Herkunft der DNA-Matrize	Basenzusammensetzung des enzymatischen Produkts				A+T G+C im Produkt	A+T G+C in der Matrize
	Ade- nin	Thy- min	Gua- nin	Cyto- sin		
<i>Micrococcus lysodeiticus</i> (ein Bakterium)	0,15	0,15	0,35	0,35	0,41	0,39
<i>Aerobacter acrogenes</i> (ein Bakterium)	0,22	0,22	0,28	0,28	0,80	0,82
<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00	0,97
Kalbsthymus	0,29	0,28	0,21	0,22	1,32	1,35
Phage T2	0,32	0,32	0,18	0,18	1,78	1,84

von Molekülen statt, was unzweideutig andere Verbindungen als Zwischenträger der genetischen Spezifität ausschließt. Es besteht somit kein Zweifel, daß die DNA als direkte Matrice für ihre eigene Bildung dient. Wie zu erwarten, hat das enzymatische Produkt, wie das Original (Primer), eine doppelhelikale Struktur.

Man weiß nicht genau, wie DNA-Polymerase auf molekularer Ebene wirkt, da wenig über ihre Struktur bekannt ist. Da sie in Zellen nur in begrenzten Mengen vorhanden ist, ist die Reinigung in großen Mengen ein ungeheuer schwieriges Unternehmen. Es ist jedoch bekannt, daß sie aus einem einzigen Polypeptid besteht, das aus ungefähr 1100 Aminosäuren aufgebaut ist. Man hofft, sie schließlich zu kristallisieren, was die Aussicht auf die Röntgenstrukturanalyse ihrer dreidimensionalen Gestalt eröffnen würde.

Die Fähigkeit der DNA-Polymerase, komplementäre Kopien von DNA-Ketten zu machen, deutete sofort darauf hin, daß sie das hauptsächliche, wenn nicht sogar das einzige Enzym in *E. coli* sein mußte, das an der Verknüpfung von Nukleotiden während der DNA-Replikation beteiligt ist. Wie wir aber später sehen werden, bestehen Zweifel, daß das richtig ist; der tatsächliche Replikationsprozeß scheint sehr kompliziert zu sein. Trotzdem war die Entdeckung der DNA-Polymerase insofern ungeheuer wichtig als sie zeigte, daß der Zusammenbau von komplementären Nukleotidsequenzen einer relativ einfachen Laboranalyse zugänglich ist.

### SICHERE BEWEISE FÜR DIE TRENNUNG VON DNA STRANGEN

Um diesen Punkt zu beweisen, mußten Methoden für die physikalische Trennung der Eltern- und Tochterstränge der DNA gefunden werden. Dies wurde zum ersten Mal durch die Verwendung schwerer Isotope wie  $^{15}\text{N}$  erreicht. Bakterien, die in einem Medium gewachsen sind, das das schwere Isotop  $^{15}\text{N}$  enthält, enthalten eine dichtere DNA als Bakterien, die unter normalen Bedingungen mit  $^{14}\text{N}$  gewachsen sind. Schwere DNA kann durch Gleichgewichtszentrifugation in konzentrierten Lösungen schwerer Salze, wie Caesiumchlorid, von leichter DNA getrennt werden. Wenn hohe Zentrifugalkräfte angewandt werden, wird die Lösung an der Außenseite des Zentrifugenröhrchens dichter. Wenn die richtige Anfangsdichte der Lösung gewählt wird, wandern die einzelnen DNA-Moleküle in den mittleren Bereich des Zentrifugenröhrchens, wo ihre Dichte der der Salzlösung gleicht. Daher sammeln sich die schweren Moleküle bei größerer Dichte, als die leichten Moleküle. Wenn Bakterien, die schwere DNA enthalten, in ein leichteres Medium (das  $^{14}\text{N}$  enthält) transferiert werden und man sie dort wachsen läßt, werden die Nukleotid-Vorstufen, die für die Verwendung bei der DNA-Synthese zur Verfügung stehen, leicht sein; daher kann man DNA, die



nach Mediumwechsel synthetisiert wurde, von DNA, die vor dem Transfer hergestellt wurde, unterscheiden.

Wenn die DNA-Replikation die Trennung von Strängen erfordert, kann man genaue Voraussagen über die Dichte der DNA-Moleküle machen, die nach verschiedenen Wachstumsintervallen in einem leichten Medium zu finden sind. Nach einer Wachstumsgeneration sollten alle DNA-Moleküle einen schweren und einen leichten Strang enthalten und daher von mittlerer hybrider Dichte sein. Dieses Resultat entspricht genau den Beobachtungen. Ebenso ist nach zwei Wachstumsgenerationen die eine Hälfte der DNA-Moleküle leicht und die andere Hälfte hybrid (Abbildung 9-9), genau wie die Strangtrennung voraussagt.

### **EINSTRÄNGIGE DNA WIRD EBENFALLS DURCH BASENPAARUNG REPLIZIERT**

Anfangs dachte man, daß alle DNA-Moleküle doppelsträngig sind, außer während der Replikation, wenn ein Teil zeitweilig in einer nicht durch Wasserstoffbrücken gebundenen, einsträngigen Form auftritt. Man war daher überrascht als experimentell eindeutig gezeigt wurde, daß die DNA verschiedener Gruppen kleiner bakterieller Viren normalerweise als zirkuläre, einsträngige Moleküle vorliegt, in denen  $A \neq T$  und  $G \neq C$  ist. Zu diesen einsträngigen DNA-Phagen gehören die Viren  $\phi \times 174$ ,  $s13$  und  $F1$ .

Die Entdeckung der einsträngigen DNA warf unmittelbar die Frage auf, ob ein zusätzlicher Kopiermechanismus existiert, in dem ein einzelner DNA-Strang als Matrize für eine identische Kopie dient. Diese Art der Replikation kann nicht durch die Bildung einer Doppelhelix erreicht werden, in der sich identische Basen durch Wasserstoffbrücken miteinander verbinden, denn solch eine Struktur ist stereochemisch unmöglich. Falls Selbstreplikation existiert, müßte sie Zwischenverbindungen der Art verwenden, wie wir sie bei der Überlegung in Erwägung zogen, ob eine Polypeptidkette eine Matrize für eine identische Kopie sein könnte. Vier verschiedene Verbindungsglieder müßten existieren, von denen jedes zwei identische Oberflächen haben müßte, die mit einer spezifischen Base mehrere Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen könnten. Die Verbindungsglieder könnten sich aneinander reihen und die Nukleotide verbinden, um eine neue Polynukleotidkette zu bilden, die mit der ersten identisch ist.

Es gibt jedoch keine Hinweise auf die Existenz solcher Verbindungsglieder. Statt dessen finden wir, daß, bald nach Eintritt des einsträngigen DNA-Moleküls (das wir den «+» Strang nennen wollen) in seine Wirtszelle, dieser Strang als Matrize für die Bildung eines komplementären «—» Stranges (Abbildung 9-10) dient. Die resultierende Doppelhelix dient wiederum ihrer-

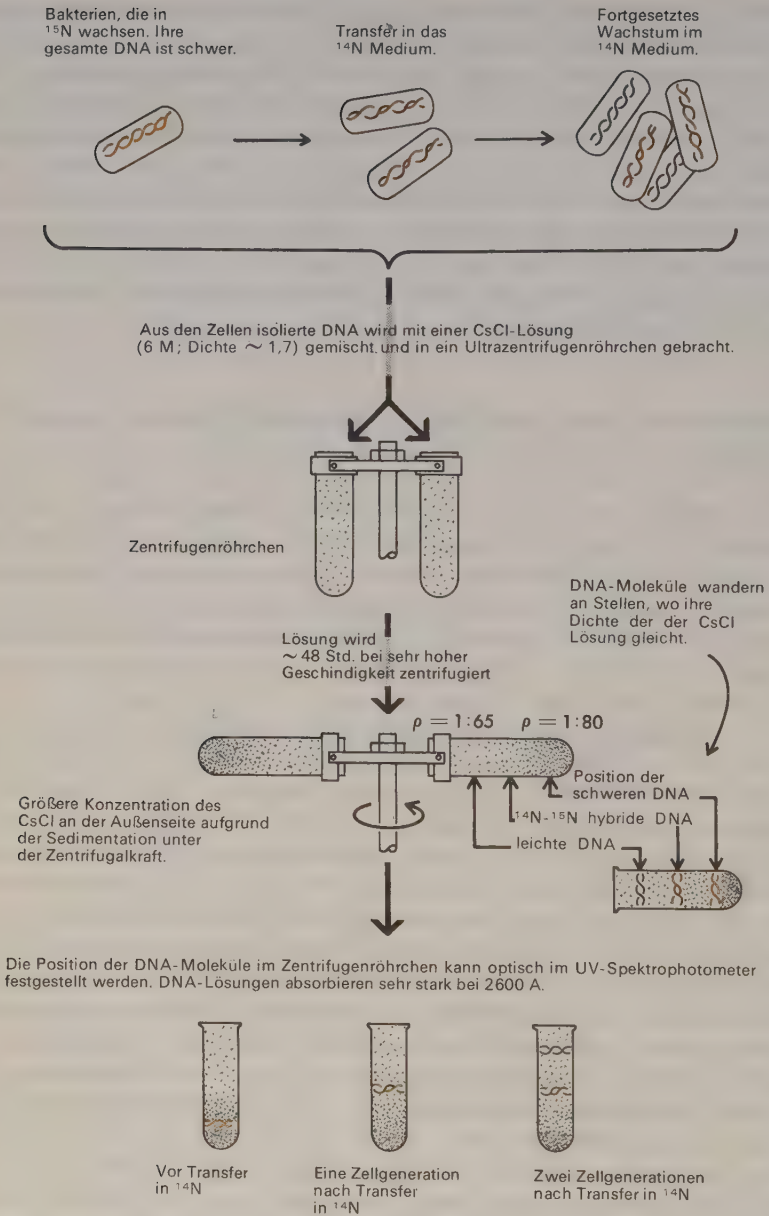
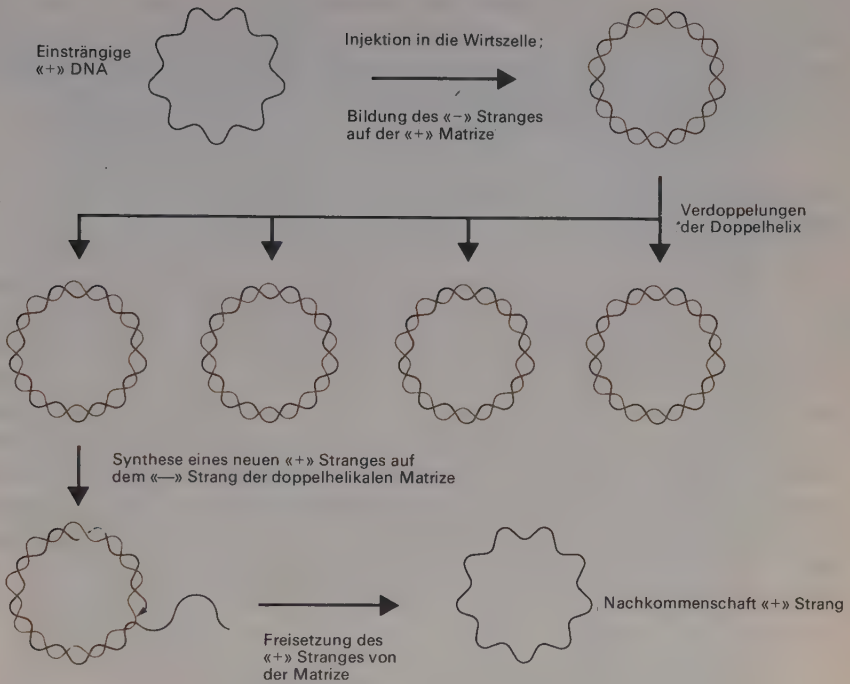


ABBILDUNG 9-9 Verwendung eines Caesiumchlorid-Dichtegradienten um zu zeigen, daß sich komplementäre Stränge während der DNA-Replikation trennen.



**ABBILDUNG 9-10** Die Replikation eines einsträngigen DNA Moleküls. Für gewöhnlich dient jede Doppelhelix als Matrize für die Bildung einer großen Anzahl von neuen «+» Strängen.

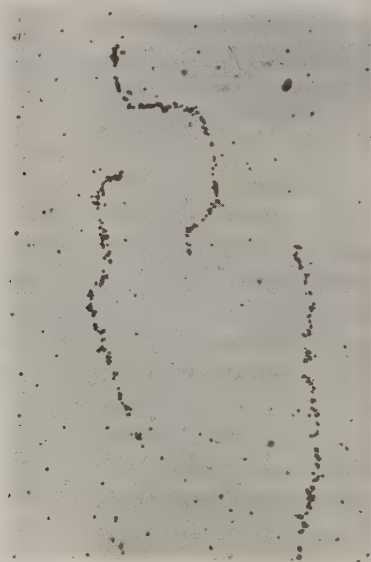
seits als Matrize für die Bildung neuer «+» Stränge, die dann in neue Viruspartikeln inkorporiert werden. Daher ist der fundamentale Mechanismus für die Anordnung der Nukleotide während der Polynukleotidsynthese einsträngiger DNA im wesentlichen der gleiche wie der für die doppelhelikale DNA. Die Auswahl eines bestimmten Nukleotids erfolgt immer durch die Anziehung der Komplementärbasen. Der Unterschied besteht darin, daß bei den einsträngigen Viren nur einer (der «-») der beiden Stränge in der Doppelhelix als Matrize für die Nachkommenschaft-DNA wirkt. Wie diese Auswahl getroffen wird, ist noch nicht bekannt.

Trotz der Existenz einsträngiger DNA in einigen Viren muß der Großteil der zellulären DNA doppelsträngig sein. Dies ergibt sich aus den Tatsachen, daß (1) die zwei Komplementärketten keine identischen Basensequenzen haben und daher (wie wir später sehen werden) gänzlich verschiedene Aminosäuresequenzen codieren und (2) daß in Bakterien (und wahrscheinlich in vielen höheren Zellen) für gewöhnlich nur ein Exemplar eines bestimmten

Gens vorhanden ist. Falls daher die einsträngige Form die normale wäre und die Doppelhelix nur kurz während der DNA Verdoppelung aufträte, dann würden die zwei Tochterzellen nach der Mitose gänzlich verschiedene Sätze genetischer Information enthalten.

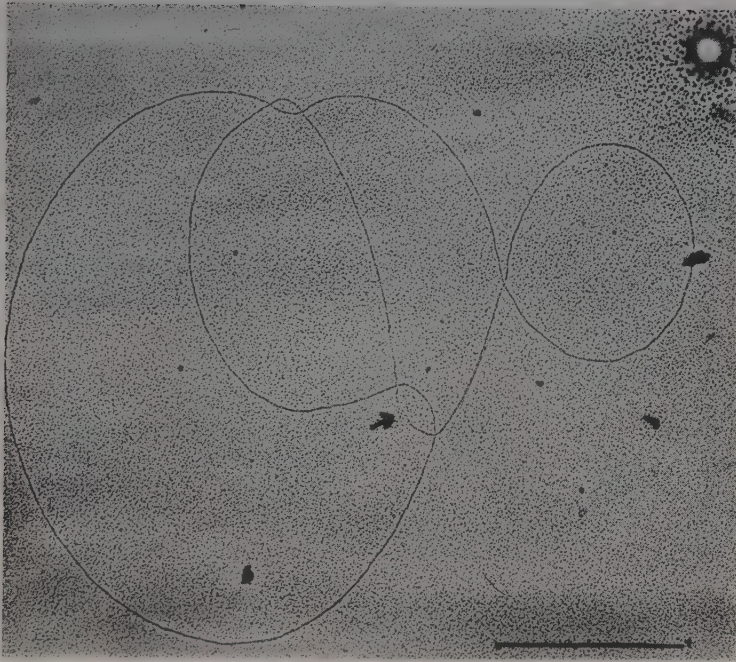
#### EINZELNE DNA-MOLEKÜLE SIND DIE CHROMOSOMEN VON VIREN UND E. COLI

Frühe Schätzungen des Molekulargewichts der DNA lagen ungefähr bei einer Million, eine Größe, die, wie wir sehen werden, dem durchschnittlichen Gen entspricht. Daher war es natürlich, einzelne DNA-Moleküle mit einzelnen Genen gleichzusetzen. Aber diese ersten Berichte waren irreführend, da die DNA während ihrer Isolierung und ihrer Untersuchung Brüche erleidet. Heute ist erwiesen, daß praktisch alle unabgebauten DNA-Moleküle die Information von mehreren Genen enthalten. Unsere besten Werte für das Molekulargewicht kommen von DNA-haltigen Viren. Zum Beispiel enthält das Bakterienvirus T2 ein DNA-Molekül von  $MG = 1,3 \times 10^8$  (Abbildung 9-11), das Bakterienvirus  $\lambda$  enthält ein einziges Molekül von  $MG = 3,2 \times 10^7$  (Abbildung 9-12). In diesen Fällen müssen wir das Chromosom, nicht das



**ABBILDUNG 9-11** Autoradiographie mehrerer T2-Chromosomen. Die Gesamtlänge beträgt 52  $\mu$ .  
(Mit freundlicher Genehmigung von J. Cairns.)





**ABBILDUNG 9-12** Elektronenmikrophotographie (von B. Chandler, University of Wisconsin) eines zirkulären  $\lambda$  DNA-Moleküls. Die Bezugslinie repräsentiert  $1\mu$ . Die Konturlänge ist  $16.3\mu$ . [Wiedergabe von H. Ris und B. C. Chandler, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 2 (1963), Abbildung 1, mit Genehmigung.]

Gen, mit einzelnen DNA-Molekülen gleichsetzen. Dies muß auch für das einzelne Chromosom einer *E. coli* Zelle getan werden; es ist ein einziges DNA-Molekül, dessen Molekulargewicht ungefähr  $2 \times 10^9$  beträgt und dessen Länge in gestrecktem Zustand fast einen Millimeter ausmacht. Die genaue Zahl der DNA-Moleküle in den Chromosomen höherer Pflanzen und Tiere ist nicht bekannt. Da Anzeichen dafür sprechen, daß die DNA-Replikation gleichzeitig an vielen Punkten eines einzelnen Chromosoms stattfindet, wurde die Anwesenheit von zumindest mehreren Molekülen nahegelegt. Auf jeden Fall sind einige DNA-Moleküle um mehrere Zehnerpotenzen größer als irgendein anderes biologisches Molekül.

## DNA-MOLEKÜLE HABEN MANCHMAL RINGFÖRMIGE GESTALT

Anfänglich deuteten unsere experimentellen Befunde, die wir größtenteils der Elektronenmikroskopie verdanken, darauf hin, daß alle DNA-Moleküle linear wären und zwei freie Enden hätten. Seit jedoch unabgebaute DNA-Moleküle leichter zugänglich wurden und betrachtet werden können, beginnt sich als Verallgemeinerung die Ansicht durchzusetzen, daß viele DNA-Moleküle normalerweise in zirkulärer Form vorliegen. Zum Beispiel wird das Chromosom des Mäusevirus Polyoma als Duplexring aus den Viruspartikeln isoliert. Wie schon erwähnt, ist die DNA des Virus  $\phi \times 174$  ein einsträngiger Ring; nach dem Eindringen in die Wirtszelle wird der einsträngige «+» Ring durch die Synthese eines neuen «-» Stranges in einen doppelsträngigen Ring umgewandelt.

Manchmal findet man ein DNA-Molekül, das linear ist, wenn es aus einer Viruspartikel (z.B. Phage  $\lambda$ ) isoliert wird, später als ringförmiges Molekül innerhalb der Wirtszelle. Dies führte zu der wichtigen Verallgemeinerung, daß die linearen und zirkulären DNA-Moleküle ineinander umgewandelt werden können. Der grundlegende molekulare Mechanismus, der einen DNA Ring in die lineare Form umwandelt, wird in Abbildung 9-13 gezeigt. Beginnend mit einem geschlossenen Ring, führen

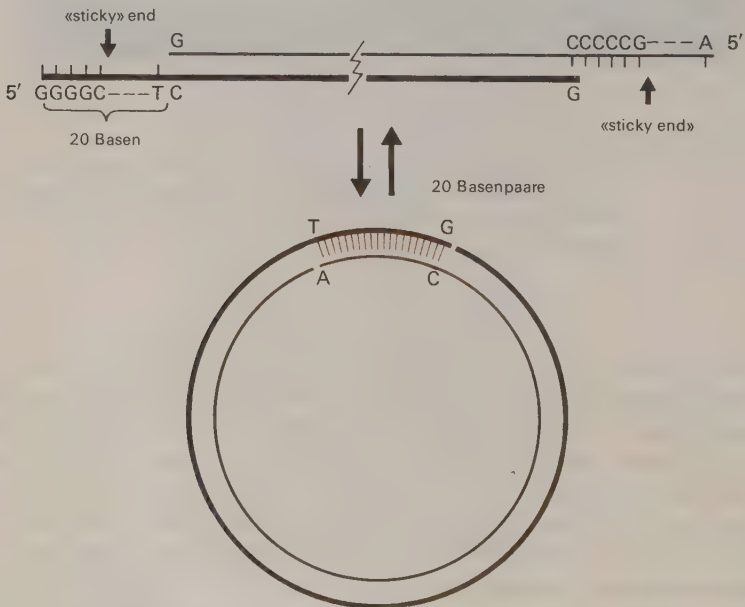


ABBILDUNG 9-13 Umwandlung der linearen und zirkulären Formen der  $\lambda$  DNA.

ein oder mehrere spezifische Enzyme zwei Brüche herbei, einen im «+» Strang und einen im «—» Strang. Da diese Brüche sehr nahe beieinander liegen, werden die dazwischen liegenden Wasserstoff-Brückenbindungen gelegentlich durch thermische Bewegung gelöst und der Ring faltet sich auf. Es ist sehr wichtig daß die sich ergebende lineare Form einsträngige Enden enthält, die komplementäre Nukleotidsequenzen (sticky ends) haben. So kann die lineare Form zu einem späteren Zeitpunkt durch Basenpaarung wieder eine zirkuläre Konfiguration annehmen. Wenn die fehlenden Phosphodiesterbindungen ersetzt werden, wird der kovalente Ring wieder hergestellt.

Es gibt jetzt sichere Beweise dafür, daß  $\lambda$  DNA zwischen zirkulärer und linearer Form wechselt und dabei genau diesen Mechanismus anwendet. Tatsächlich zeigen alle linearen Formen die bis jetzt untersucht wurden, die Fähigkeit, unter gewissen Bedingungen Ringe zu bilden. Wir nehmen jetzt an, daß die relevante Form für den Verdoppelungsprozeß der Virus-DNA der Ring ist und daß die Stäbchenform, die in Phagen zu finden ist, eine Adaptierung für die Injektion des Viruschromosoms durch den schmalen Schwanzteil ist.

Anfangs wurde die Möglichkeit erwogen, daß ringförmige Moleküle eine Besonderheit von Viren und ihrer Replikation wären. Diese Hypothese wurde durch die Entdeckung, daß das *E. coli*-Chromosom (DNA-Molekül) ebenso als Ring anzutreffen ist, eindeutig widerlegt. Es ist daher notwendig, sich ganz allgemein zu fragen, warum DNA-Moleküle fähig sein sollten, Ringe zu bilden. Die ansprechendste Hypothese ist, daß zirkuläre DNA ein Mittel ist, ungewünschte DNA-Replikation zu verhindern. Während der Zellteilung muß sich jedes Chromosom einmal, nicht zweimal oder mehrmals, replizieren. Ein denkbarer Weg, dies zu erreichen, wäre, daß das DNA-Molekül, außer während der Zeit im Zellzyklus, wenn DNA-Replikation erwünscht ist, zirkuläre Form annimmt.

## REPLIKATION EINES BIOLOGISCH AKTIVEN DNA-MOLEKÜLS IM REAGENZGLAS

Vor kurzer Zeit wurde das Enzym DNA-Polymerase bei der Synthese biologisch aktiver Viruschromosomen verwendet. Das Viruschromosom, das bei diesen *in vitro* Experimenten repliziert wurde, war das des einsträngigen DNA-Phagen  $\phi \times 174$ . Wenn zu den zirkulären  $\phi \times 174$  DNA-Molekülen DNA-Polymerase und Nukleosidtriphosphatvorläufer zugegeben wurden, fand an den parentalen «+» Strängen «—» Strangsynthese statt. (Abbildung 9-14). Die Beigabe des DNA-verknüpfenden Enzyms Polynukleotidligase (Abbildung 9-15), um die neu synthetisierten «—» Stränge zu schließen, resultierte in intakten zirkulären Doppelhelices, die mit DNA-Polymerase

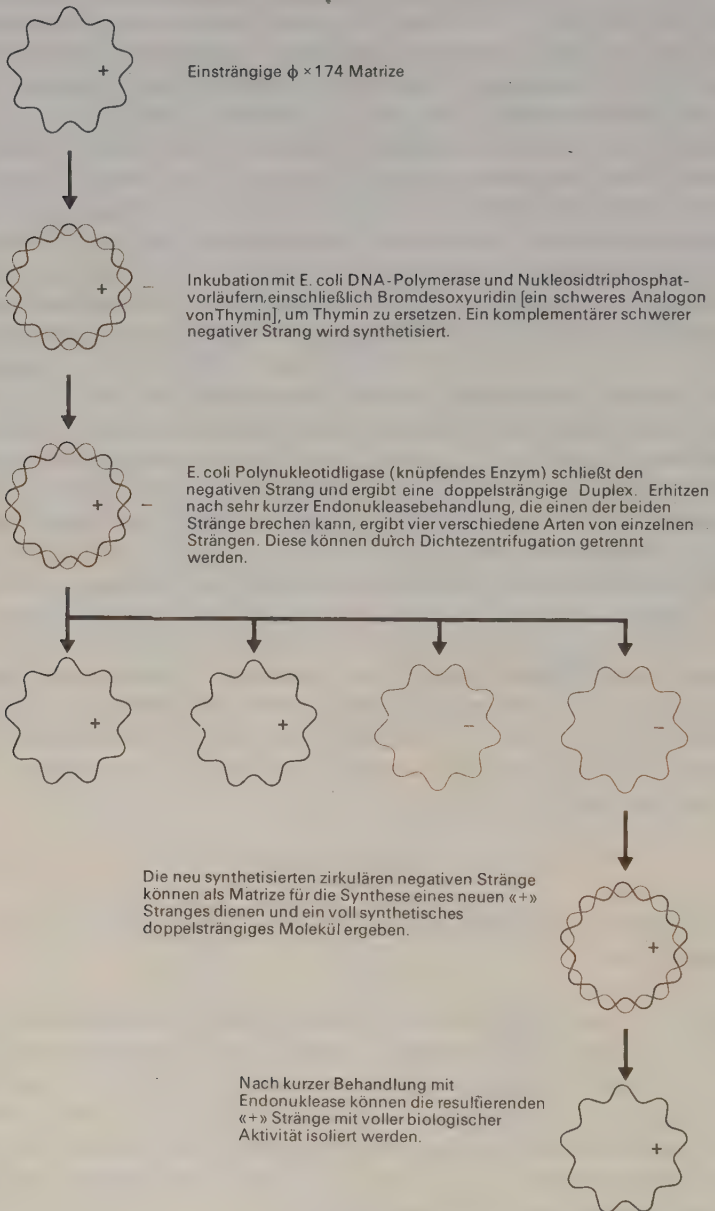
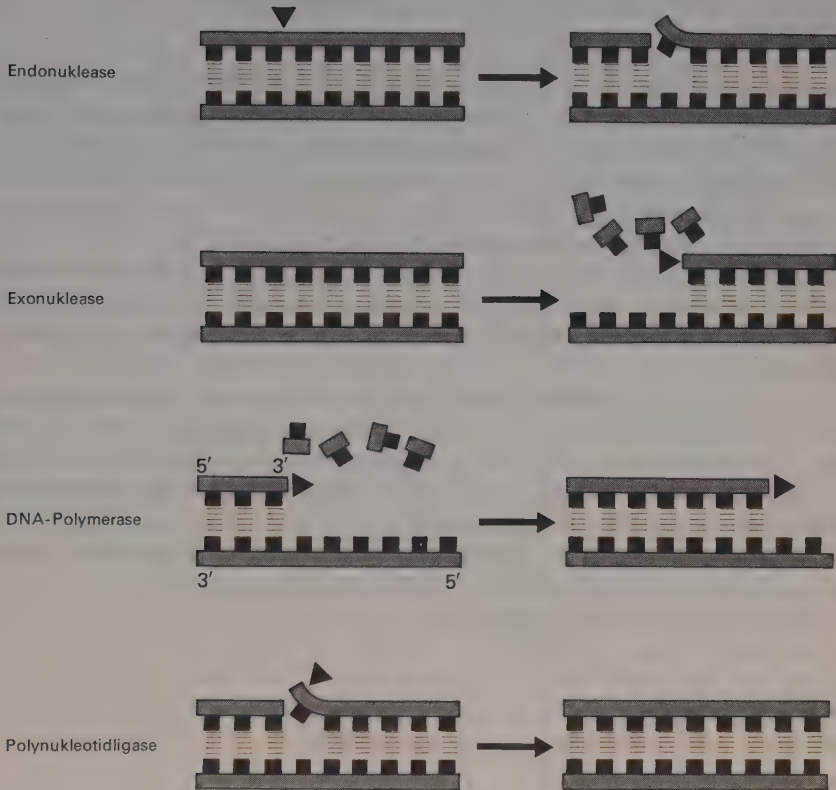


ABBILDUNG 9-14 Schritte der in vitro Synthese infektiöser  $\phi \times 174$  DNA.





**ABBILDUNG 9-15** Schematische Darstellung der Wirkung vier verschiedener Enzyme bei der Herstellung und Spaltung der Skelettbindungen der DNA.

keine Matrizenaktivität zeigten. Wenn man jedoch mit einer Nuklease unspezifisch Brüche (nicks) in die zirkulären Doppelhelices einführte, war es möglich, eine Anzahl noch intakter neu synthetisierter «—» Stränge zu isolieren. Die Verwendung dieser intakten «—» Stränge als weitere Matrizen erlaubte einen weiteren Syntheseprozess, diesmal von intakten zirkulären «+» Strängen. Nachkommenschafts-«+» Ringe erwiesen sich als biologisch aktiv, d.h. fähig, Virusvermehrung zu initiieren. Somit ist der Kopierprozeß, der durch DNA-Polymerase erreicht wird, äußerst genau. Aber dieses Experiment beantwortet nicht die Frage, wie doppelsträngige, zirkuläre DNA repliziert wird - die bei diesen Experimenten verwendete Matrize war einsträngig, nicht das gewöhnliche doppelsträngige Material.

## DIE REPLIKATION MUSS MIT EINEM ENDONUKLEASESCHNITT BEGINNEN

Ein wesentlicher erster Schritt in der normalen Replikation zirkulärer Duplex-DNA muß die enzymatische Einführung eines Bruchs in zumindest einem der beiden parentalen Stränge sein. Diese Tatsache wird durch die Unfähigkeit kovalent geschlossener  $\phi \times 174$  Doppelhelices, als Matrizen zu wirken, deutlich gezeigt. Geschlossene Ringe werden nur zu Matrizen, nachdem ein Bruch eingeführt wird, der den zwei parentalen Strängen erlaubt, sich voneinander zu lösen. Ein früher oder vielleicht sogar der auslösende Vorgang bei der Replikation, muß daher die durch ein spezifisches Enzym erfolgte Einführung eines oder mehrerer Brüche im Skelett des zirkulären Chromosoms sein.

Enzyme, die interne Phosphodiesterbindungen spalten, werden Endonukleasen genannt (Abbildung 9-15). Die Endonuklease(n), die zu Beginn der DNA-Replikation eine Rolle spielt (spielen), muß (müssen) daher zuerst eine sehr spezifische Sequenz von Nukleotiden, die am Anfangspunkt der Replikation zu finden ist, erkennen (sich mit ihr verbinden). Gegenwärtig werden große Anstrengungen unternommen, eine dieser «initiiierenden» Nukleasen zu finden. Obwohl bis jetzt alle Resultate negativ waren, sollte sich bald ein positives Ergebnis einstellen.

## HINWEISE AUF SPEZIFISCHE ANFANGSPUNKTE

Sichere Hinweise für spezifische Anfangspunkte für die Replikation erhalten wir durch Studien über den Zeitablauf der Verdoppelung spezifischer Virus- und Bakteriengene. Bei  $\lambda$ -Phagen beginnt die DNA-Replikation immer auf der parentalen DNA-Duplex nahe dem Gen O und die Synthese geht von diesem Punkt (dem Ursprung) sowohl im Uhrzeigersinn als auch gegen den Uhrzeigersinn nach außen weiter. Dieses Ergebnis wurde anfänglich mit großer Überraschung aufgenommen, da praktisch jeder angenommen hatte, daß das Wachstum nur in einer Richtung fortlaufen würde. Wie jedoch später zu sehen sein wird, erscheint das Wachstum in beiden Richtungen nicht verwunderlich, wenn man spezifische Molekülmodelle für die Replikation in Betracht zieht. Studien mit *E. coli* zeigen, daß die DNA-Replikation an einem bestimmten Punkt nahe dem Arginin H Gen (ungefähr 8 Uhr auf der genetischen Karte) beginnt und einige vor kurzer Zeit durchgeführte Experimente deuten darauf hin, daß auch hier das Wachstum in beiden Richtungen um den Ring herum weitergeht.

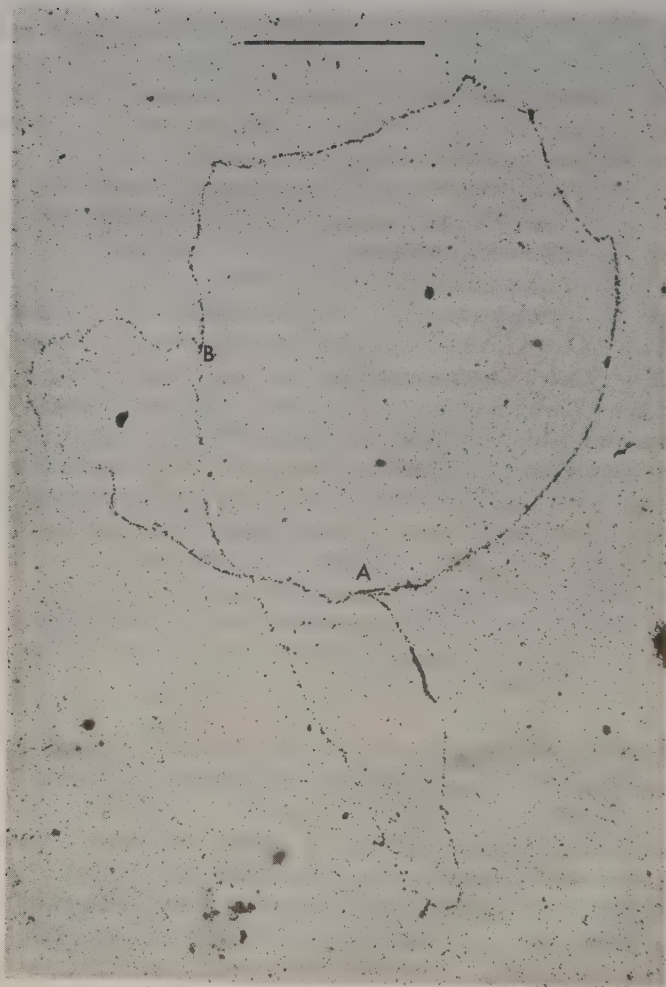
## DIREKTE DARSTELLUNG SICH REPLIZIERENDER DNA

Heute ist es leicht, DNA, die im Replikationsprozeß begriffen ist, zu isolieren und sie durch autoradiographische Methoden und durch Elektronenmikroskopie darzustellen. Solche Methoden lassen oft  $\theta$ -förmige Replikationsstrukturen erkennen, wie sie in den Abbildungen 9-16 und 9-17 gezeigt werden. Diese Strukturen schließen deutlich einen zweistufigen Replikationsprozeß aus, in dem sich die parentalen Stränge zuerst gänzlich aufdrehen und erst später als Matrizen für neue Doppelhelices dienen. Bei allen bis jetzt dargestellten Replikationsstrukturen gibt es keinen Beweis für ausgedehnte Bereiche mit einsträngigem Material. Das heißt, die neuen Polynukleotidstränge werden synthetisiert, während sich die Parentalstränge trennen.

Andere Eigentümlichkeiten dieser Aufnahmen sind jedoch nicht so leicht zu interpretieren. Besonders rätselhaft ist das Fehlen freier Enden und das Problem, das sich daraus für das Aufdrehen unreplizierten Materials ergibt. Das Aufdrehen solcher Strukturen verlangt die Anwesenheit eines oder mehrerer molekularer Drehpunkte, um die das nichtreplizierte Material rotieren kann (Abbildung 9-18). Unglücklicherweise ist dieser Gedanke sehr schwer in eine genaue molekulare Form zu übertragen. Besonders schwer zu verstehen ist der Vorgang, der stattfindet, wenn die Replikation über den angenommenen Drehpunktsbereich abläuft. Man muß auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die  $\theta$ -förmigen Strukturen nicht innerhalb der Zellen existieren, sondern sich nur während der Isolierung des sich replizierenden Materials bilden. Auf diesen Punkt werden wir später noch zurückkommen.

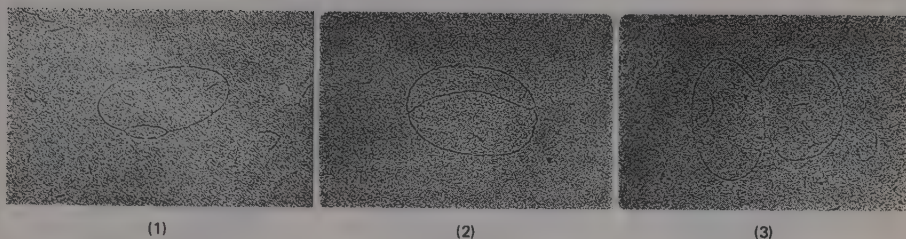
## DAS KETTENWACHSTUM GEHT SOWOHL IN DER 5' NACH 3' ALS AUCH IN DER 3' NACH 5' RICHTUNG VOR SICH

Das Vorhandensein doppelsträngiger DNA an den Wachstumsstellen bedeutet, daß beide parentale Stränge als Matrizen für die Synthese neuer DNA dienen. Somit findet die Verlängerung (Elongation) der beiden Tochterstränge praktisch gleichzeitig statt. Dies zeigt an, daß die grundsätzliche Richtung des Kettenwachstums für einen Tochterstrang 5' nach 3' sein muß und für den anderen Tochterstrang 3' nach 5'. Diese umgekehrten Polaritäten ergeben sich aus den entgegengesetzten Kettenrichtungen der Doppelhelix: eine verläuft aufwärts (+), die andere abwärts (—). Aber die DNA-Polymerase, das einzige bekannte Enzym, das Nukleotide an DNA anknüpfen kann, tut dies nur, indem sie die Ketten in Richtung von 5' nach 3' fortsetzt. Die chemische Reaktion, die es katalysiert, erlaubt einem Nukleosidtriphosphat nur, mit dem freien 3' Ende eines wachsenden Polynukleotidstranges



**ABBILDUNG 9-16** Autoradiographie der Y-förmigen Wachstumspunkte eines *E. coli* Chromosoms. Die DNA wurde während zweier Generationen der DNA-Replikation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markiert. Das  $\theta$ -förmige Aussehen ist darauf zurückzuführen, daß man ein zirkuläres Chromosom betrachtet, das zu zwei Dritteln verdoppelt wurde. Der Maßstab zeigt 100  $\mu$ . [Wiedergegeben nach J. Cairns, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 44 (1963), mit Genehmigung.]





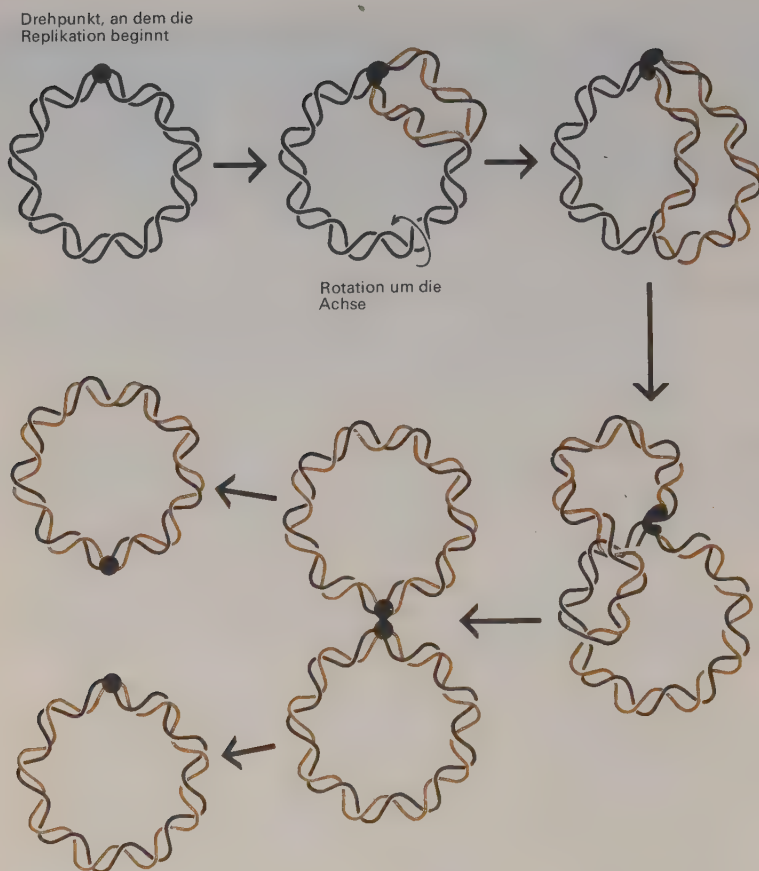
**ABBILDUNG 9-17** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von drei sich replizierenden Polyoma DNA-Molekülen. (Freundlicherweise von Dr. Bernhard Hirt zur Verfügung gestellt). Unreplizierte Kreise haben ein Molekulargewicht von  $3 \times 10^6$ , was eine Konturlänge von  $1,5\mu$  ergibt.

zu reagieren. Man fragte sich daher, ob es noch ein anderes replizierendes Enzym gibt! Trotz intensiver Forschungen wurde jedoch kein Enzym mit der erforderlichen 3' nach 5' Spezifität *in vitro* nachgewiesen.

#### DIE BEDEUTUNG DER KLEINEN FRAGMENTE, DIE NAHE AN DEN WACHSTUMSPUNKTEN ZU FINDEN SIND

Vor kurzem rief die Entdeckung, daß viele der in Polynukleotidketten inkorporierten Nukleotide anfangs nicht in langen Ketten, sondern als Teile kurzer Polynukleotidfragmente auftreten, große Aufregung hervor. Sehr wichtig ist, daß diese kurzen Fragmente Sequenzen haben, die sowohl den «+» als auch den «—» parentalen Strängen komplementär sind. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, daß die Tochterstrang-Replikation oft die schrittweise Verbindung sehr kurzer Polynukleotidfragmente mit sich bringt, von denen jedes einzelne in der 5' nach 3' Richtung wächst (Abbildung 9-19). Auf diese Art könnte ein einziges Enzym für die Herstellung aller Tochterstränge verantwortlich sein.

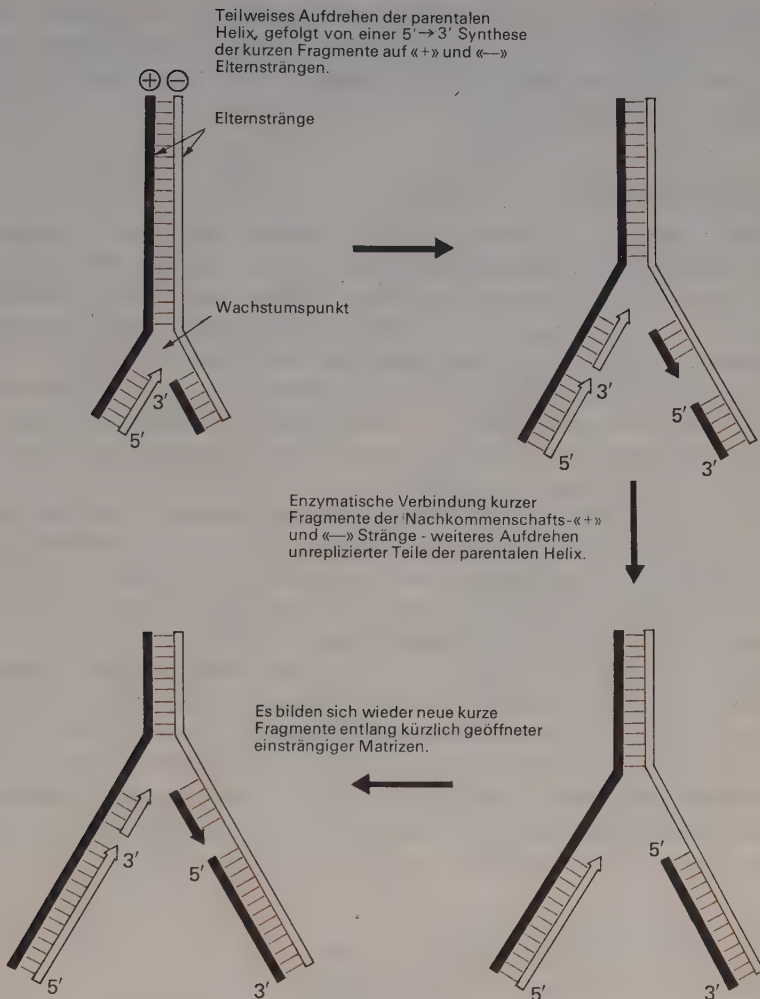
Unter Annahme dieser Vorstellung ergibt sich, daß das Aufdrehen der beiden Elternstränge an der Replikationsgabel kurz vor der Synthese der Nachkommenschaftskomplemente erfolgt und dabei kurze Spannen einsträngiger parentaler DNA erzeugt. Dies wiederum führt zu der Frage, ob eine positive Kraft existiert, die das Aufdrehen fördert. In diesem Zusammenhang ist die kürzlich erfolgte Entdeckung (vergleiche Seite 296) eines Proteins, das sich unspezifisch an einsträngige DNA bindet, attraktiv. Ein denaturierendes Protein dieser Art könnte das Auseinanderwinden der doppelsträngigen DNA am Wachstumspunkt erleichtern.



**ABBILDUNG 9-18** Ein frühes Modell für die Replikation eines zirkulären DNA-Moleküls. Die Synthese bewegt sich immer in einer bestimmten Richtung und beginnt an einem spezifischen Anfangspunkt. Da die Komplementärstränge spiralförmig umeinander gedreht sind, muß die parentale Helix rotieren, wenn sich die Stränge trennen. Bei diesem Modell existiert an der Stelle, wo die Replikation beginnt, ein Drehpunkt. [Wiedergabe nach J. Cairns, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 43 (1963), mit Genehmigung.]

#### BINDUNG DES TOCHTERPOLYNUKLEOTIDMATERIALS AN ELTERNSTRÄNGE

Lange Zeit schien es am einfachsten, anzunehmen, daß sich das Polynukleotidmaterial der Tochterstränge niemals kovalent an die parentalen Stränge binden würde. Die Bindung würde offensichtlich bei der normalen Trennung



**ABBILDUNG 9-19** Hypothese, daß die Replikation beider Nachkommenstränge die Verbindung kurzer Fragmente erfordert, die alle in der 5' nach 3' Richtung synthetisiert wurden.

von Eltern- und Tochtersträngen im Verlauf der Replikation zu Komplikationen führen. Als zum ersten Mal die Behauptung aufgestellt wurde, daß viel Tochtermaterial kovalent an Elternmaterial gebunden wäre, schien es daher am vernünftigsten, diese Erkenntnis zu ignorieren bis sie überprüft werden konnte. Heute jedoch besteht kein Zweifel, daß viele neue Stränge

zu wachsen beginnen, indem sie sich an freie Enden schon existierender Stränge anhängen. Darüber hinaus dauert das Wachstum solcher Ketten oft an bis sie die doppelte Länge des schon vorher bestehenden Stranges erreichen.

### **DAS «ROLLING CIRCLE» - MODELL**

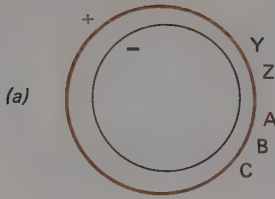
Die Erkenntnis, daß die Replikation die Verlängerung schon bestehender Ketten mit sich bringt, führte unweigerlich zu der Idee des Rolling Circle (Drehkreises). Dieses Replikationsschema beginnt mit einem spezifischen Einschnitt in einen Strang des parentalen Doppelstrang-Ringes und wandelt dabei diesen Strang in ein Polynukleotid mit zwei freien Enden um. (Abbildung 9-20). Jedes Ende ist chemisch verschieden: an einem Ende enthält das Nukleotid einen Zuckerrest mit einer freien 3'OH-Gruppe, während das Nukleotid am anderen Ende eine freie 5' Phosphatgruppe trägt (vergleiche Seite 91). Die DNA-Synthese beginnt mit dem Anheften von neuen Nukleotidvorläufern an das freie 3'OH-Ende des geöffneten Stranges; dieser Kettenverlängerungsprozeß könnte durch DNA-Polymerase katalysiert werden. Gleichzeitig mit der Kettenverlängerung wird das andere Ende des Stranges (das 5' Ende) als freies Ende zunehmender Länge aufgerollt. Neue DNA wird in kleinen Fragmenten auf die Enden gelagert, schließlich werden die Fragmente durch das DNA-verbindende Enzym, Polynukleotidligase, verknüpft.

Diese Replikationsstruktur wird «rolling circle» genannt, da das Aufdrehen des freien Einzelstranges mit der Rotation der doppelhelikalen Matrize um die Helixachse Hand in Hand geht. Solch ein Aufdrehen schafft keine topologischen Probleme, da der Kreis durch nur einen intakten Polynukleotidstrang zusammengehalten wird, der sich frei um viele der kovalenten Bindungen dreht, die das Skelett enthält.

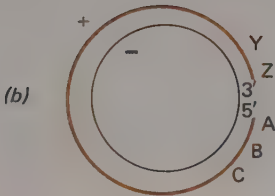
### **MODELL ZWEIER ROLLING CIRCLES, DIE SICH IN ENTGEGENGESETZTER RICHTUNG DREHEN**

Das einfache Rolling Circle-Modell selbst erklärt jedoch die DNA-Replikation nicht hinreichend. Erstens führt es nur zu Wachstum in einer Richtung, nicht in beiden. Zweitens liefert es keine Erklärung für die Herkunft der  $\theta$ -förmigen Replikationsstrukturen. Statt dessen sagt es ein  $\sigma$ -förmiges Zwischenprodukt voraus, in dem das freie Ende keinen ersichtlichen Grund hat, sich auf den zirkulären Teil zurückzubiegen. Diese beiden Einwände verschwinden jedoch, wenn man annimmt, daß das replizierende Molekül das Produkt zweier Drehkreise ist, die sich in entgegengesetzten Richtungen bewegen.

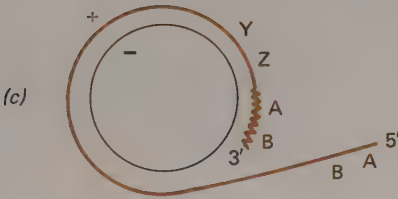




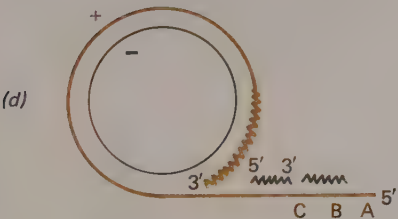
Replikation beginnt auf einem geschlossenen DNA Ring



Eine die Sequenz erkennende Endonuklease schneidet den positiven Strang ein.



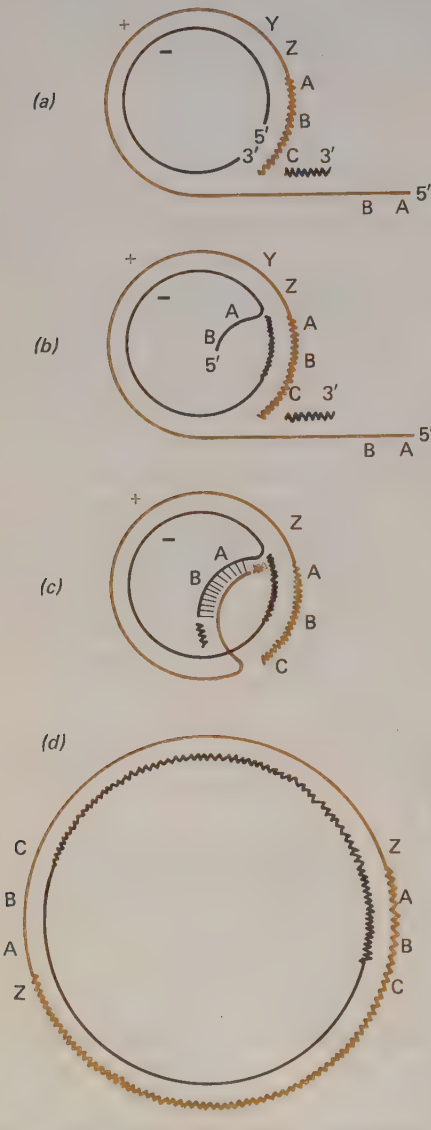
Die DNA-Polymerase fügt am 3' Ende des offenen Stranges Nukleotide zu und schiebt dabei ein Ende weg. Die korrekten Nukleotide werden durch Wasserstoff-Brückenbindung an die Matrize des negativen Stranges ausgewählt. Wenn immer neue Nukleotide ausgewählt werden, wird der positive Strang länger als die Einheitslänge.



Komplementäre Fragmente werden auf dem verlängerten Ende synthetisiert und wandeln es dabei in doppelhelikale Form um.

**ABBILDUNG 9-20** Erzeugung eines DNA-Stranges, der größer als die Einheitslänge ist, nach dem «Rolling Circle»-Modell.

In einem Modell dieser Art wird ein zweiter Einschnitt, nahe dem ersten Nukleaseschnitt, in den noch intakten Strang gemacht (Abbildung 9-21). Das ermöglicht einem zweiten Ende, sich abzuschälen und die Verlängerung beginnt an dem neu geschaffenen 3'OH Ende. Sowie das Ende länger wird,

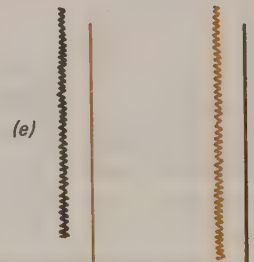


Ein zweiter Initiationsvorgang findet statt, wenn eine zweite Nuklease einen Einschnitt in den negativen Strang macht.

DNA-Polymerase beginnt, Nukleotide an das 3' Ende des geöffneten negativen Stranges anzufügen und verdrängt dabei ein zweites Ende.

Die Enden im und gegen den Uhrzeigersinn können sich dann mittels Wasserstoffbrücken entweder während der Replikation oder während der Isolierung der replizierenden DNA aus der Zelle verbinden.

Ein Ring doppelter Größe ist das unmittelbare Ergebnis der Replikation. Er wird durch die Wirkung spezifischer Endonukleasen in zwei lineare DNA-Moleküle des  $\lambda$ -Typs umgewandelt (vergleiche Abbildung 9-13).



**ABBILDUNG 9-21** Ein Schema für DNA-Replikation mit zwei Rolling Circles, die sich in entgegengesetzter Richtung bewegen.

werden Komplementärfragmente darauf gelagert, die schließlich durch Polynukleotidligase miteinander verbunden werden. Es ist äußerst wichtig, daß die Schlußsequenzen der beiden Enden komplementär sind und sich in einem späteren Stadium über Wasserstoffbrücken miteinander verbinden können, um ein  $\theta$ -förmiges Molekül zu bilden.

Solange die Enden nicht durch Wasserstoffbrücken verbunden sind, ergibt sich kein Hindernis beim Aufdrehen. Aber im Moment der Verbindung muß das Auseinanderwinden aufhören. Somit ergibt sich die Möglichkeit, daß sich  $\theta$ -förmige Strukturen nur während oder nach ihrer Isolierung aus der Wirtszelle bilden. Wenn im Gegensatz dazu  $\theta$ -Formen in der Zelle existieren, erfordert die Replikation zusätzliche Nukleaseschnitte, die zeitweilig Perioden schnellen Auseinanderwindens erlauben. Diese Unterbrechungen können nicht sehr lange andauern, denn sie müssen zu Ende sein, bevor die Replikationsgabel über sie hinwegwandert - was derzeit eine ziemlich schwierige Aufgabe zu sein scheint.

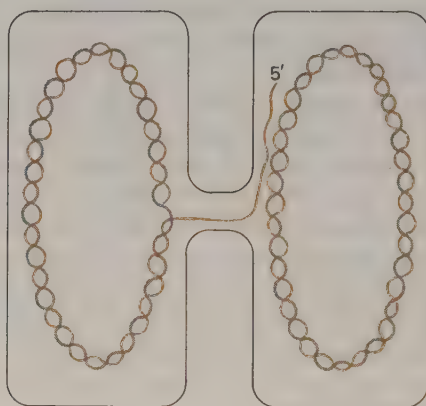
Das Produkt dieses in entgegengesetzter Richtung laufenden Rolling Circle-Modells ist ein DNA-Ring doppelter Länge. Dies wirft das Problem auf, wie der Kreis doppelter Größe in zwei Tochterchromosomen gespalten wird. Es wäre denkbar, daß eine sequenzerkennende Endonuklease solche Kreise doppelter Größe in zwei lineare DNA-Moleküle des  $\lambda$ -Typs umwandelt (Abbildung 9-21). Diese könnten entweder linear bleiben oder ihre einsträngigen komplementären Enden benützen, um einen Ring zu schließen. Es bestehen schon Hinweise für Virusringe doppelter Größe in Zellen, und genetische Forschungen zeigen, daß einige dieser Moleküle das Produkt von DNA-Replikation sind und nicht das einer Rekombination zweier zirkulärer Moleküle von Einheitsgröße.

Trotz der erfreulichen Einfachheit dieses Modells gibt es bis jetzt noch keinen wirklichen Grund, anzunehmen, daß alle seine Eigenschaften stimmen. Zum Beispiel könnte man sich vorstellen, daß der zweite Nukleaseschnitt, der den zweiten Drehkreis erzeugt, im gleichen Strang stattfindet, der schon durch den ersten Schnitt gespalten wurde. Wenn das der Fall wäre, wären die sich ergebenden Produkte zwei Ringe der Einheitsgröße, nicht ein Ring doppelter Größe. Zusätzlich bestehen, wie wir später noch erwähnen werden, beträchtliche Zweifel über die genaue Rolle der DNA-Polymerase bei der Replikation eines Großteils der DNA.

## EINZELNE ROLLING CIRCLES

Einige Arten der DNA-Replikation sind am besten auf der Basis einer Replikationszwischenstufe zu erklären, die entweder ein Ende im Uhrzeigersinn oder eines gegen den Uhrzeigersinn enthält, aber nicht beide. Wenn

sich zum Beispiel Bakterien paaren, ist die DNA, die das männliche Bakterium in das weibliche überträgt, einsträngig, nicht doppelsträngig. Der Paarungsprozeß beginnt mit einem Einschnitt in einen Strang des männlichen Chromosoms. Dieser Strang wird an seinem 3' Ende verlängert, was zu einer Verschiebung des 5' Endes in die weibliche Zelle führt (Abbildung 9-22). Sobald die männliche DNA innerhalb des Empfängers ist, wird sie in gewöhnliche doppelhelikale DNA umgewandelt. Sie kann dann, durch genetische Rekombination, gegen einen Teil des ursprünglichen weiblichen Chromosoms ausgetauscht werden. Die Übertragung koppelt somit DNA-Replikation und Paarung derart daß sie niemals zu genetisch unvollständigen männlichen Eltern führt.



**ABBILDUNG 9-22** Übertragung einsträngiger DNA von einem männlichen Bakterium in ein weibliches mittels des Rolling Circle Mechanismus.

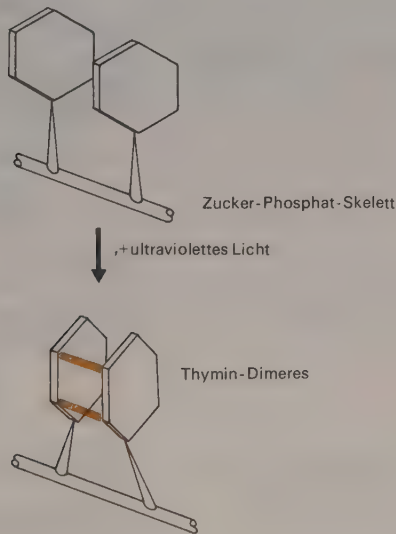
## REPARATURSYNTHESE

Bis vor kurzer Zeit glaubten die meisten Biochemiker, daß ihre *in vitro* Experimente, bei denen sie die Verknüpfung von Nukleotiden zu Polynukleotidketten erforschten, unbedingt mit dem gewöhnlichen Replikationsprozeß in der Zelle verwandt wären. Das Vertrauen in diese Annahme wurde durch die Entdeckung verschiedener Arten von Reparatursynthese schwer erschüttert. Früher dachte man, daß eine Polynukleotidkette intakt bleiben mußte, wenn sie während der Chromosomenreplikation weitergegeben werden sollte. Von Ereignissen wie Röntgen- oder ultravioletter (UV) Bestrahlung, die Ketten brachen oder die Struktur spezifischer Basen änderten, nahm man an, daß sie aunahmslos letal wären. Jetzt weiß man, daß es mehrere unter-



schiedliche Arten von Reparaturprozessen gibt. Zu einem großen Teil wurden sie durch die Entdeckung von Mutanten mit erhöhter Empfindlichkeit gegen Strahlungsschäden gefunden. Darauf folgende biochemische Untersuchungen deckten dann das Fehlen eines spezifischen Reparaturprozesses in diesen Mutanten auf. Das heißt, in normalen Zellen wird ein großer Teil der Strahlungsschäden für gewöhnlich repariert, bevor sie Zeit haben, sich zu äußern.

Am besten versteht man den Fall der Erzeugung von Thymin-Thymin Dimeren durch UV Licht. Wenn UV Licht von nebeneinander liegenden Thymin Molekülen absorbiert wird, verbinden sie sich miteinander und bilden die in Abbildung 9-23 gezeigte Struktur. Wenn er nicht repariert wird, geht dieser Vorgang normalerweise tödlich aus; die verknüpften Thymin Moleküle funktionieren nicht als echte Matrizen für die Herstellung von Nachkommen. Gewöhnliche Replikation findet normalerweise nur statt, wenn die Dimeren herausgeschnitten werden. Dies erfolgt in mehreren Schritten;



**ABBILDUNG 9-23** Bildung von Thymin-Dimeren durch UV Bestrahlung.

jeder Schritt wird durch ein spezifisches Enzym vermittelt. Es ist denkbar, daß beim ersten Schritt eine spezifische Endonuklease den beschädigten Bereich erkennt und den betreffenden Polynukleotidstrang auf einer Seite des Dimeren einschneidet. Im zweiten Schritt könnte eine Exonuklease Nukleotide abbauen, die dem Schnitt benachbart sind. Im dritten Schritt verbinden sich die 5'-Nukleosidtriphosphate mit der sich ergebenden einsträngigen Region

und werden daraufhin durch ein Enzym, möglicherweise DNA-Polymerase, mit dem 3'-Ende eines benachbarten Kettenfragments verknüpft. Im letzten Schritt wird die sich ergebende Lücke durch das Verbindungsenzym Polynukleotidligase geschlossen (Abbildung 9-24).

In praktisch allen untersuchten Zellen - von Bakterien zu höheren Pflanzen und Tieren - gibt es Beweise für die Existenz von Reparaturprozessen. Dies ist nicht überraschend, da alle Zellen ständig verschiedenen Formen von Strahlung ausgesetzt sind. Während der Evolution müssen jene Zellen,

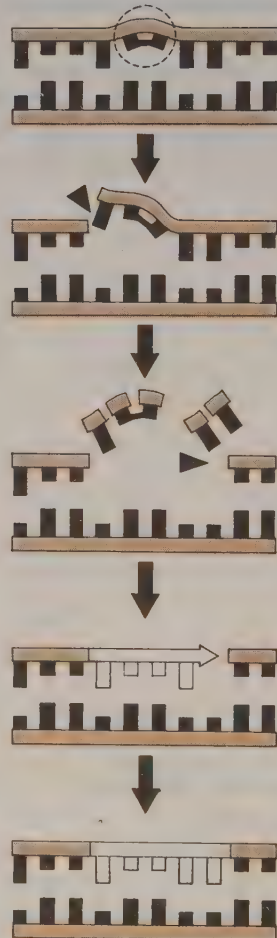
1. Eine Verzerrung im DNA Molekül, hervorgerufen durch ein durch UV-Licht induziertes Thymin-Dimere.

2. Eine spezifische Endonuklease schneidet das Skelett einer Kette nahe dem Dimeren auf.

3. Die Ausschneidung (Excision) eines kleinen Bereiches, der das Thymin-Dimere enthält, durch Exonuklease.

4. 5'-3' Synthese eines neuen Stranges. Die korrekten Basen werden durch Basenpaarung mit denen des intakten Stranges eingefügt.

5. Polynukleotidligase verbindet die beiden Enden des Stranges und das «reparierte» Molekül ist vollständig.



**ABBILDUNG 9-24** Einige der enzymatischen Schritte bei der Reparatur von DNA-Molekülen, die Thymin-Dimere enthalten.

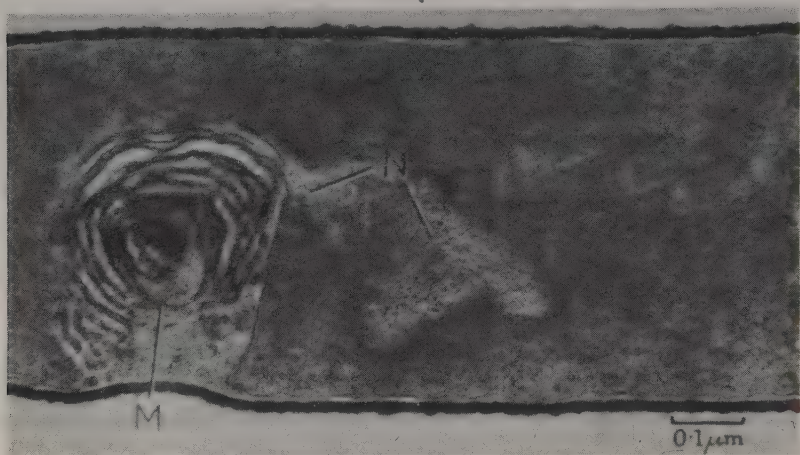
die verbesserte enzymatische Systeme für die Reparatur beschädigter DNA-Moleküle besaßen, einen ungeheuren selektiven Vorteil gehabt haben. Tatsächlich könnte die Entwicklung eines Reparatursystems eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung von Organismen mit immer größeren DNA Mengen gewesen sein. Denn je größer die Menge der notwendigen DNA, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte Strahlungs-dosis zu einem letalen Ereignis führen könnte.

### ZELLEN OHNE DNA-POLYMERASE

Die schrittweise Anfügung von Nukleotiden an wachsende Ketten, wie man sie sich mit Hilfe des Rolling Circle-Modells vorstellt, erfordert die Beteiligung eines Enzyms mit einer Spezifität wie die der DNA-Polymerase. Vor kurzer Zeit wurde jedoch eine *E. coli* Mutante isoliert, der dieses Enzym fehlt, die aber trotzdem ihre DNA mit gewöhnlicher Geschwindigkeit repliziert. Es ist sehr wichtig, daß diese Mutante erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht zeigt und ihr somit eines der Enzyme fehlen muß, das am Reparaturprozeß beteiligt ist. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß DNA-Polymerase manchmal eine Rolle bei der Reparatur spielt. Es bedeutet jedoch nicht, daß sie nicht auch an der Replikation beteiligt ist. In diesem Fall müßten wir aber die Existenz von mindestens zwei Enzymen mit der Spezifität der DNA-Polymerase voraussetzen, von denen jedes entweder reparieren oder replizieren kann. Nach diesem Schema ist eine Zelle lebensfähig, solange sie zumindest eines dieser Enzyme besitzt. Leider müssen wir wiederum auf die Frage zurückkommen, warum, trotz intensiver Forschungen, kein anderes Enzym gefunden wurde, das Nukleotide in Polynukleotidketten inkorporiert.

### DIE ROLLE DER MEMBRAN BEI DER REPLIKATION

Die Antwort mag in der Notwendigkeit der gleichzeitigen Anwesenheit intakter Teile der Bakterienmembran liegen. Es gibt ausgezeichnete zytologische Beweise für die Verbindung bakterieller Chromosomen mit invaginierten Teilen der Zellmembran, die Mesosomen genannt werden (Abbildung 9-25). *In vivo* Transformationsexperimente mit DNA, bei denen Fragmente des Bakterienchromosoms als Spender von genetischem Material verwendet werden, weisen darauf hin, daß der Teil der DNA, der mit der Membran verbunden ist, nahe dem Bereich liegt, wo die Replikation beginnt. Das heißt, daß die gesamte Replikation auf oder nahe der Membran stattfinden könnte, wobei eins oder mehrere der replizierenden Enzyme ein integraler



**ABBILDUNG 9-25** *Verbindung eines Bacillus subtilis Chromosoms mit einer Invagination (Mesosom) der bakteriellen Membran. (N) nukleares Chromosomenmaterial; (M) Mesosome. (Aufnahme von A. Ryter, Institut Pasteur, Paris freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)*

Bestandteil der Membran selbst sein würde. Wenn dies der Fall ist, erscheint es nicht überraschend, daß dieses Enzym (diese Enzyme) noch nicht entdeckt wurde. Bei der Herstellung der meisten bis jetzt untersuchten zellfreien Systeme wurden die Zellwand und die Membranbestandteile routinemäßig entfernt. Der Verdacht, daß die Isolierung intakter Membranen mit den an sie gebundenen DNA-Molekülen für den künftigen Fortschritt zum Verständnis, wie sich DNA repliziert, notwendig sein wird, ist nicht sehr erfreulich. Trotz großer Anstrengungen weiß man fast nichts über die Struktur einer Membran, sei es eine bakterielle oder eine andere. Nichtsdestoweniger könnte die Richtung, die man zu einem künftigen Fortschritt nehmen muß, schließlich klar sein

## ZUSAMMENFASSUNG

Das primäre genetische Material ist DNA. Sie besteht für gewöhnlich aus zwei Polynukleotidketten, die zu einer regelmäßigen Helix umeinander gewunden sind. Jede Kette enthält eine sehr große Anzahl von Nukleotiden. Es gibt vier hauptsächliche Nukleotide und ihre Sequenz entlang einer gegebenen Kette ist sehr unregelmäßig. Die beiden Ketten werden durch Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Paaren von Basen zusammengehalten. Adenin (Purin)



verbindet sich immer mit Thymin (Pyrimidin) und Guanin (Purin) immer mit Cytosin (Pyrimidin). Die Existenz der Basenpaare bedeutet, daß die Sequenzen von Nukleotiden entlang der beiden Ketten nicht identisch, sondern komplementär sind. Wenn die Sequenz einer Kette bekannt ist, ist die ihres Gegenstücks automatisch bekannt.

Die Verdoppelung der DNA in der Zelle findet statt, wenn die beiden Stränge getrennt sind, was es den einzelnen Strängen ermöglicht, als Matrize für die Bildung komplementärer Stränge zu dienen. Die Stränge trennen sich nicht vollständig vor der Synthese neuer Stränge. Statt dessen läuft die Verdoppelung Hand in Hand mit der Trennung der Stränge. Die monomeren Vorläufer für die DNA-Synthese sind die Desoxynukleosidtriphosphate, die in Anwesenheit von DNA-Matrizen enzymatisch miteinander verknüpft werden. Die Auswahl der korrekten Nukleotide durch Wasserstoff-Brückenbindung an die korrekten Matrizenbasen ist ein sehr genauer Prozeß. Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit eines Fehlers bei der Einfügung eines neuen Nukleotids kann, unter optimalen Bedingungen, nur  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  sein.

Individuelle DNA-Moleküle können sehr groß sein. Sie kommen entweder als Ringe oder als lineare Moleküle vor, die die Fähigkeit haben, Ringform anzunehmen. Tatsächlich scheint das *E. coli*-Chromosom ein einziges zirkuläres DNA-Molekül mit einem MG von ungefähr  $2$  bis  $4 \times 10^9$  zu sein. Es ist wichtig, daß die linearen DNA-Moleküle Ringform annehmen können, da Aufnahmen sich aktiv replizierender DNA zirkuläre Konfigurationen zeigen.

Die Initiation der Replikation beginnt an einer festgelegten Stelle auf dem zirkulären Chromosom und das Wachstum vieler Ketten beginnt mit der Verlängerung schon existierender Stränge. Höchst wahrscheinlich sind zumindest einige Enzyme (Ringöffnung, Verlängerung, Ringschluß) an der Replikation beteiligt. Einige dieser Enzyme wirken wahrscheinlich auch bei der Reparatur beschädigter DNA-Moleküle mit. Eines oder mehrere dieser Enzyme, die direkt mit dem Replikationsprozeß verbunden sind, könnte mit Teilen der Bakterienmembran assoziiert sein. Ein Beweis für diese Hypothese kann jedoch schwierig sein, da die Kenntnis bakterieller Membranen auf molekularer Ebene sehr gering ist.

## LITERATUR

- Watson, J. D., und F. H. C. Crick, «Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid», *Nature*, 177:964 (1953).
- Meselson, M., und F. W. Stahl, «The Replication of DNA in *Escherichia coli*», *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44:671 (1958). Ein klassisches Experiment der Molekularbiologie, das zeigt, daß die DNA-Replikation die Trennung der zwei komplementären Polynukleotidketten erfordert.

- Kornberg, A., «The Synthesis of DNA», *Sci. Am.*, Oktober 1968. Eine Beschreibung der Replikation einsträngiger DNA im Reagenzglas.
- Kornberg, A., «Active Center of DNA Polymerase», *Science*, **163**, 1410 (1969). Eine mehr technische Beschreibung vieler der eleganten Versuche, die aus dem Laboratorium des Autors in Stanford hervorgegangen sind.
- Cairns, J., und C. I. Davern, «Mechanism of DNA Replication in Bacteria», *J. Cell Physiology*, **70**: Suppl. I, S. 65 (1967). Eine kurze und klare Zusammenfassung vieler der gegenwärtigen Probleme auf dem Gebiet der DNA-Synthese.
- «Replication of DNA in Microorganisms», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33** (1968). Eine sehr ausführliche Zusammenfassung aller Aspekte der DNA-Synthese ist in dieser Sammlung von 89 Arbeiten, die während einer Tagung im Juni 1968 vorgetragen wurden, zu finden.
- Thomas, C. A., Jr., und L. D. MacHattie, «The Anatomy of Viral DNA Molecules», *Ann. Rev. Biochem.*, **36**: 2. Teil, 485 (1967). Eine ausgezeichnete Einführung in die Art und Weise, wie sich die zirkulären und linearen Formen der DNA ineinander umwandeln.
- Richardson, C. C. «Enzymes in DNA Metabolism», *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 795 (1969). Eine äußerst befriedigende Übersicht über die verschiedenen Enzyme, von denen man derzeit annimmt, daß sie bei der DNA-Replikation und Reparatur beteiligt sind.
- De Lucia, Paula und J. Cairns, «Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase», *Nature*, **224**, 1164, (1969).
- Gross, J. und Marilyn Gross, «Genetic Analysis of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase», *Nature*, **224**, 1166 (1969). Diese und die obige Arbeit dokumentieren die Mutante, die die Aktivität der DNA-Polymerase verloren hat.

# 10

## DIE GENETISCHE ORGANISATION DER DNA

Sogar bevor die Doppelhelix entdeckt wurde, war die einfachste vorstellbare Hypothese, daß die genetische Information der DNA ihren Sitz in der Sequenz ihrer verschiedenen Nukleotide hätte. Aber bis zur Entdeckung der Struktur bestand die Möglichkeit, daß die Kenntnis der Anordnung der Nukleotide allein nicht ausreichen würde. Der wahre Schlüssel könnte in irgendeiner seltsamen 3-D-Form liegen, die nicht leicht, wenn überhaupt, aus der Basensequenz abzuleiten wäre. Glücklicherweise zeigt uns die Doppelhelix, daß alle Nukleotide geometrisch gleichwertig sind, wodurch eindeutig klar gemacht wird, daß der genetische Code seinen Sitz in ihren linearen Sequenzen hat.

### THEORETISCH KANN ES EINE ÜBERAUS GROSSE ANZAHL VON VERSCHIEDENEN SEQUENZEN GEBEN

Da das Zucker-Phosphat-Skelett für alle DNA-Moleküle gleich ist, kann es notwendigerweise keine genetische Information tragen, sondern die Information muß statt dessen in der Sequenz der vier (A, G, C, T) Basen enthalten sein. Dieses Erfordernis legt jedoch der tatsächlichen Menge der Information in DNA keine wirkliche Beschränkung auf. Da jedes Molekül sehr lang ist, ist die Anzahl der Sequenzpermutationen  $4^n$ , wobei  $n$  die Anzahl der Nukleotide in einem gegebenen Molekül ist. Mit den vier Buchstaben A, T, C und G des Alphabets der Nukleinsäure kann eine praktisch

unbegrenzte Zahl von genetischen Botschaften codiert werden. Die mögliche Anzahl der verschiedenen Gene mit dem  $MG = 10^6$  beträgt  $4^{1500}$ , ein Wert, der viel größer ist als die Zahl der verschiedenen Gene, die in allen Chromosomen seit dem Ursprung des Lebens vorhanden waren.

## MUTATIONEN SIND VERÄNDERUNGEN IN DER SEQUENZ DER BASENPAARE

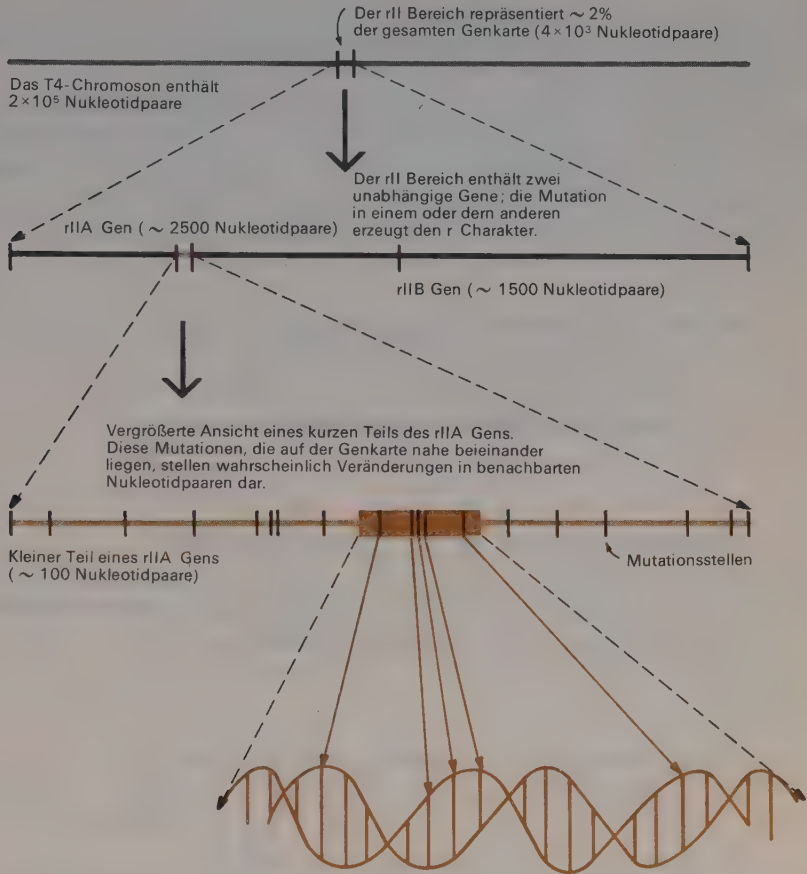
Die genetische Kartierung des T4rIIA-Gens zeigte zumindest 500 Stellen, an denen Mutationen auftreten können und zwischen denen genetische Rekombination (Crossing-over) möglich ist. Die Größe dieser Zahl zeigt uns sofort, daß diese Stellen die spezifischen Basenpaare auf dem Gen sind (Abbildung 10-1).

Viele Mutationen entsprechen einem Austausch innerhalb eines Basenpaares von, z.B., AT nach GC, CG oder TA (Abbildung 10-2). So ist es durch genaues Studium der Genkarte möglich, wichtige Information über die Sequenz der Basenpaare auf dem DNA-Molekül zu erhalten, allerdings mit einer großen Einschränkung. Es besteht kein Grund, von vornherein anzunehmen, daß alle Veränderungen im genetischen Code notwendigerweise funktionelle Veränderungen in den entsprechenden Proteinen verursachen. Es ist daher wahrscheinlich, daß es weit mehr Nukleotidpaare gibt als beobachtete mutationsfähige Stellen.

Meistens ist der Austausch einer einzelnen Base reversibel und oft ist die Häufigkeit der «Rückmutation» zu der normalen Nukleotidanordnung von ähnlicher Größenordnung wie die Mutationshäufigkeit. Diese Mutationen spiegeln am wahrscheinlichsten einen Fehler beim Replikationsvorgang wider. Entweder bilden sich nicht die richtigen Wasserstoffbrücken (Abbildung 10-3) oder ein Adenin paart sich fälschlicherweise mit Guanin (oder Cytosin mit Thymin). Es gibt auch seltene Stellen, wo das Ausmaß der Mutation (der Rückmutation) den umgekehrten Schritt weit übertrifft. Die meisten dieser sehr mutationsfähigen Nukleotidpaare —«hot spots»— entstehen wahrscheinlich nicht durch normale Verdoppelung, sondern sind, wie wir später sehen werden, mit falschen Paarungen während des Crossing-over verbunden.

Mit Ausnahme der hot spots stimmt die allgemeine Häufigkeit der spontanen Mutationen mit unserer früheren Annahme über die Genauigkeit der Basenpaarung während der Replikation überein. Die durchschnittliche Häufigkeit von feststellbaren Mutationen beträgt  $10^{-6}$  pro Genverdoppelung. Diese Zahl kann nur dann auf die Nukleotide übertragen werden, wenn wir abschätzen können, welcher Teil der Basenpaare unverändert bleiben muß, um die normale Genfunktion aufrecht zu erhalten. Wenn wir annehmen,



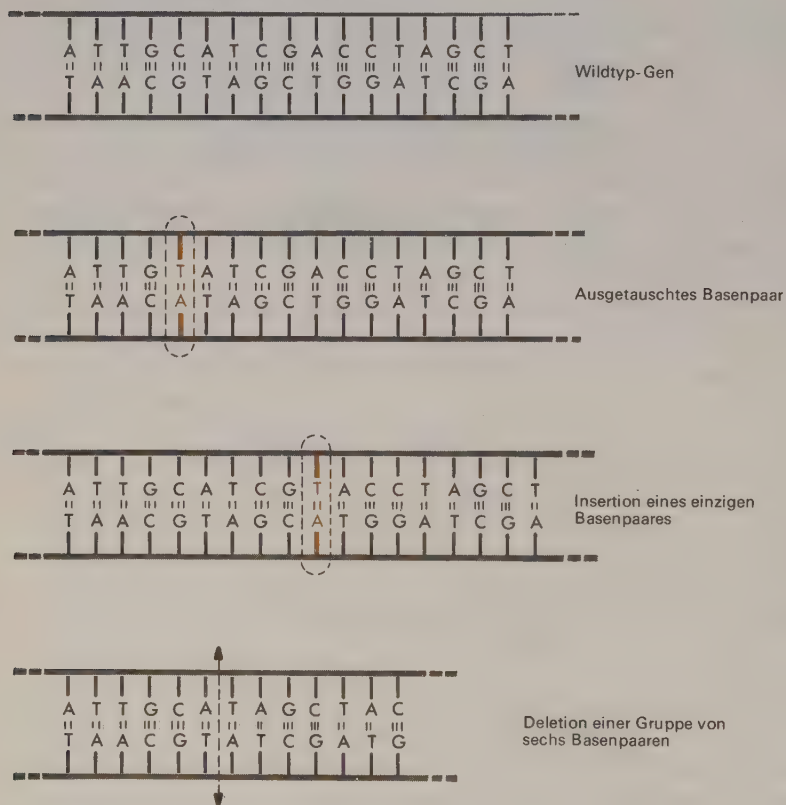


**ABBILDUNG 10-1** Die Beziehungen von Mutationen im rII Bereich des Chromosoms des Phagen T4 zur Struktur der DNA.

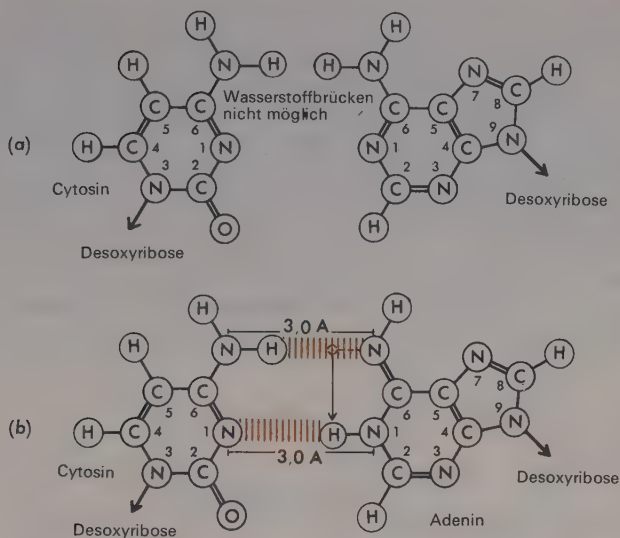
daß alle diese Basenpaare notwendig sind, dann ist die Fehlerhäufigkeit in einem Gen mit 1000 Nukleotiden ungefähr  $10^{-9}$  pro Nukleotidreplikation. Nur für die rII Gene existieren genügend Daten, um den Teil von Basenpaaren abzuschätzen, deren Veränderung zu einer erkennbaren Mutation führt. Die 500 derzeit bekannten mutationsfähigen Stellen repräsentieren zumindest ein Viertel und möglicherweise die Hälfte der gesamten Genkarte. Jedoch finden im rII Gen mehr erkennbare Mutationen statt als in vielen anderen Loci. Hier beträgt die gesamte Mutationshäufigkeit (sogar wenn wir die hot spots ausschließen) ungefähr  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$ . Dies könnte bedeuten, daß in den meisten anderen Genen viel weniger Nukleotidverän-

derungen zurkennbaren Mutationen führen als in den rII Genen. Wenn dies zutrifft, kann die allgemeine Fehlerhäufigkeit bis zu  $10^{-7}$  pro Nukleotid-replikation betragen.

Andere spontane Mutationen gehen auf den Verlust (Deletion) oder den Einschub (Insertion) von Nukleotiden zurück. Manchmal sind hunderte bis tausende von Nukleotiden an der Deletion beteiligt und in seltenen Fällen gehen ganze Gene verloren. Die umgekehrte Mutation zur normalen Anordnung der Gene, die bei großen Deletionen und Insertionen offensicht-



**ABBILDUNG 10-2** Drei Klassen von Mutationen entstehen durch das Einführen von Defekten in die Sequenz der Basen (A, T, G, C), die mit dem Skelett des DNA-Moleküls verbunden sind. In einer Klasse wird ein Basenpaar ganz einfach durch ein anderes ersetzt (d.h. G-C zu A-T). In der zweiten Klasse wird ein Basenpaar eingeschoben (oder geht verloren). In der dritten Klasse geht eine Gruppe von Basenpaaren verloren (oder wird eingeschoben).

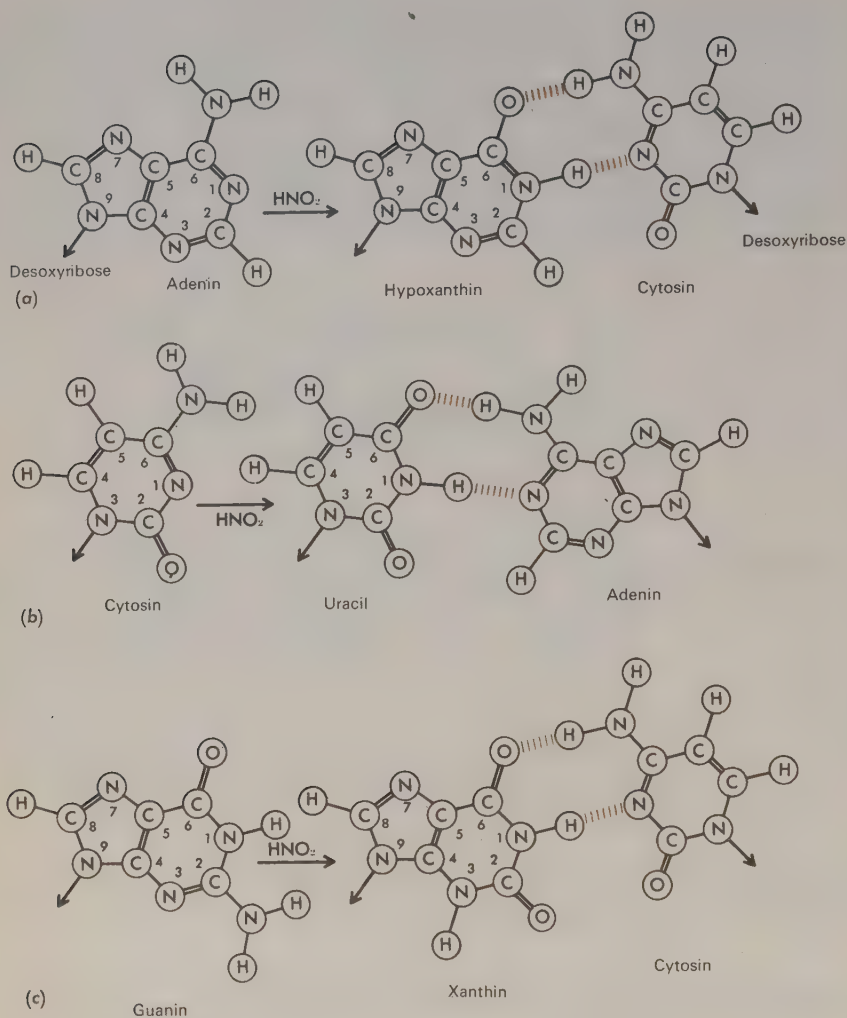


**ABBILDUNG 10-3** Beweis, wie die Spezifität der Basenpaarung in DNA durch die Wasserstoffbrücken bestimmt wird. Die Wasserstoffatome sind durch geschlossene Kreise gekennzeichnet, die Bindungen durch |||. (a) zeigt, warum die Paarung von Cytosin mit einem Adeninmolekül mit der stabilsten Anordnung von Wasserstoffatomen nicht zu Wasserstoff-Brückenbindungen führen kann. (b) zeigt, wie die Wanderung eines Wasserstoffatoms von der 6-Aminogruppe zu der N<sub>1</sub> Position in einem Adeninmolekül die Wasserstoffbindung mit Cytosin erlaubt. Die normale Position des Wasserstoffatoms wird durch den kleinen offenen Kreis angedeutet. (Die gezeigten Größen stimmen nur annähernd.) (Gezeichnet nach W. Hayes, The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Blackwell, Oxford, 1964, S. 228, mit Genehmigung.)

derungen zu lich unmöglich ist, findet für einfache Mutationen von nur einem Nukleotid nur mit geringer Häufigkeit statt.

#### GENAUE ANGABEN ÜBER EINIGE CHEMISCHE MUTAGENE

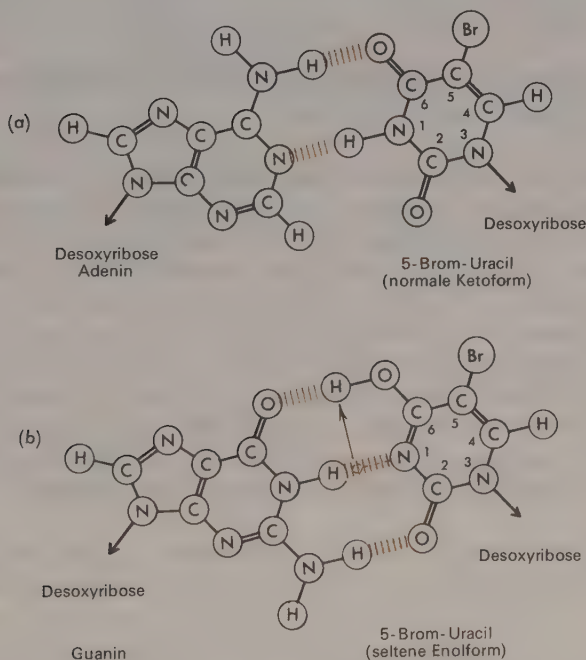
Jetzt ist es endlich möglich, vernünftige Aussagen darüber zu machen, wie einige Mutagene Veränderungen im genetischen Code erzeugen. Z.B. ist salpetrige Säure (HNO<sub>2</sub>) ein sehr starkes Mutagen, denn es wirkt direkt auf die Nukleinsäuren und ersetzt Aminogruppen durch Ketogruppen. Somit ändert sie den genetischen Code direkt, indem sie eine Base in eine andere umwandelt (Abbildung 10-4). Andere Substanzen verursachen Mutationen, weil sie in das DNA-Molekül selbst inkorporiert werden. Diese letztgenannten Verbindungen sind Basenanaloga, die aufgrund ihrer strukturellen



**ABBILDUNG 10-4** Die oxydative Desaminierung von DNA Basen durch salpetrige Säure und ihre Wirkungen auf darauffolgende Basenpaarung. (a) Adenin wird zu Hypoxanthin desaminiert, das sich mit Cytosin statt mit Thymin verbindet. (b) Cytosin wird zu Uracil desaminiert, das sich mit Adenin statt mit Guanin verbindet. (c) Guanin wird zu Xanthin desaminiert, das sich weiterhin mit Cytosin verbindet, obgleich nur über zwei Wasserstoffbrücken. Thymin und das Uracil der RNA enthalten keine Aminogruppe und bleiben daher unverändert. (Gezeichnet nach W. Hayes, *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*, Blackwell, Oxford, 1964, S. 280, mit Genehmigung.)



Ähnlichkeit mit den normalen DNA Basen in DNA inkorporiert werden können, ohne daß ihre Fähigkeit, sich zu replizieren, zerstört wird. Ihre andersartigen Strukturen sind jedoch oft der Anlaß dafür, daß die Bildung der Basenpaare weniger genau vor sich geht als gewöhnlich, was zu Fehlern während des Replikationsprozesses führt. Eines der stärksten Mutagene unter den Basenanaloga ist 5-Brom-Uracil, ein Analogon von Thymin. Man nimmt an, daß es Mutationen hervorruft, da sein Wasserstoffatom in Position 1 nicht so fest gebunden ist wie das entsprechende Wasserstoffatom in Thymin. Manchmal ist dieses Wasserstoffatom an das Sauerstoffatom gebunden, das mit dem Kohlenstoffatom 6 verknüpft ist (Abbildung 10-5). Wenn dies der Fall ist, kann 5-Brom-Uracil sich mit Guanin paaren.



**ABBILDUNG 10-5** Die Basenpaarungseigenschaften des 5-Brom-Uracils. (a) In der normalen Ketoform, mit einem Wasserstoffatom in der  $N_1$  Position, bindet sich Brom-Uracil an Adenin. (b) In der seltenen Enolform bestimmt eine tautomere Veränderung dieses Wasserstoffatoms die spezifische Paarung mit Guanin. (Gezeichnet nach W. Hayes, *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*. Blackwell, Oxford, 1964, S. 278, mit Genehmigung.)

## DIE ABSTÄNDE ZWISCHEN DEN GENEN SIND VERHÄLTNISSMÄSSIG KURZ

Für gewöhnlich findet viel weniger Crossing-over zwischen Mutationen an benachbarten Enden zweier nebeneinander liegender Gene statt als zwischen Mutationen an den äußeren Enden sogar der kürzesten Gene. Daraus kann man schließen, daß benachbarte Gene oft durch verhältnismäßig wenige Nukleotidpaare getrennt sind. Eine Bestätigung dieser Annahme wird erst möglich sein, wenn die genauen Nukleotidsequenzen einer Anzahl benachbarter Gengruppen chemisch bestimmt ist. Bis vor kurzer Zeit schien diese Aufgabe praktisch unmöglich, aber neue Methoden zeigen jetzt zum ersten Mal lange Abschnitte von Nukleotidsequenzen bestimmter viraler Chromosomen. Wie wir in Kapitel 13 sehen werden, zeigen die ersten intergenischen Sequenzdaten eine Gruppe von 30 Nukleotidpaaren, die die zwei Gene trennen.

## ÜBEREINSTIMMUNG DER GENKARTE MIT DEM ENTSPRECHENDEN ABSTAND AUF EINEM DNA-MOLEKÜL

Seit die Analyse des Crossing-over begann, haben sich Genetiker damit beschäftigt, wie genau ihre Karten mit der tatsächlichen Länge des Chromosoms übereinstimmen. Die Darstellung der langgestreckten Speicheldrüsenchromosomen der *Drosophila* in den 30er Jahren ermöglichte die genaue Kartierung der Mutationenstellen. Gute Korrelationen zwischen den tatsächlichen und den genetischen Abständen in den Abschnitten einiger Chromosomen wurden gezeigt. Aber diese Darstellungen von Chromosomen im Lichtmikroskop sagen uns nichts über die Anordnung der konstituierenden DNA-Moleküle. Sichere Antworten auf molekularer Ebene waren erst möglich, als man in der Lage war, die Stellen der spezifischen Mutationen auf einem gut definierten viralen Chromosom (DNA-Molekül) zu lokalisieren.

Das bis jetzt am besten erforschte Chromosom ist das des Phagen  $\lambda$ . Es wurden verschiedene Methoden angewendet, um den einzelnen Mutationen definierte Orte zuzuordnen. Die erste stützte sich auf unsere Fähigkeit, DNA-Helices in Fragmente bestimmter Größe zu spalten, indem man sie in einem Mixer rührt. Eine gewisse Rührgeschwindigkeit spaltet DNA in Hälften, eine höhere Geschwindigkeit ergibt Viertel und so weiter. Fragmente verschiedener Dichte können dann durch Gleichgewichtszentrifugation in einem Caesiumchloridgradienten voneinander getrennt werden. Da GC-reiche Fragmente eine höhere Dichte haben als AT-reiche, wird die Trennung routinemäßig möglich, wenn die verschiedenen Fragmente verschiedene AT/GC Verhältnisse aufweisen. Dies trifft für  $\lambda$  zu, wo die linke Seite

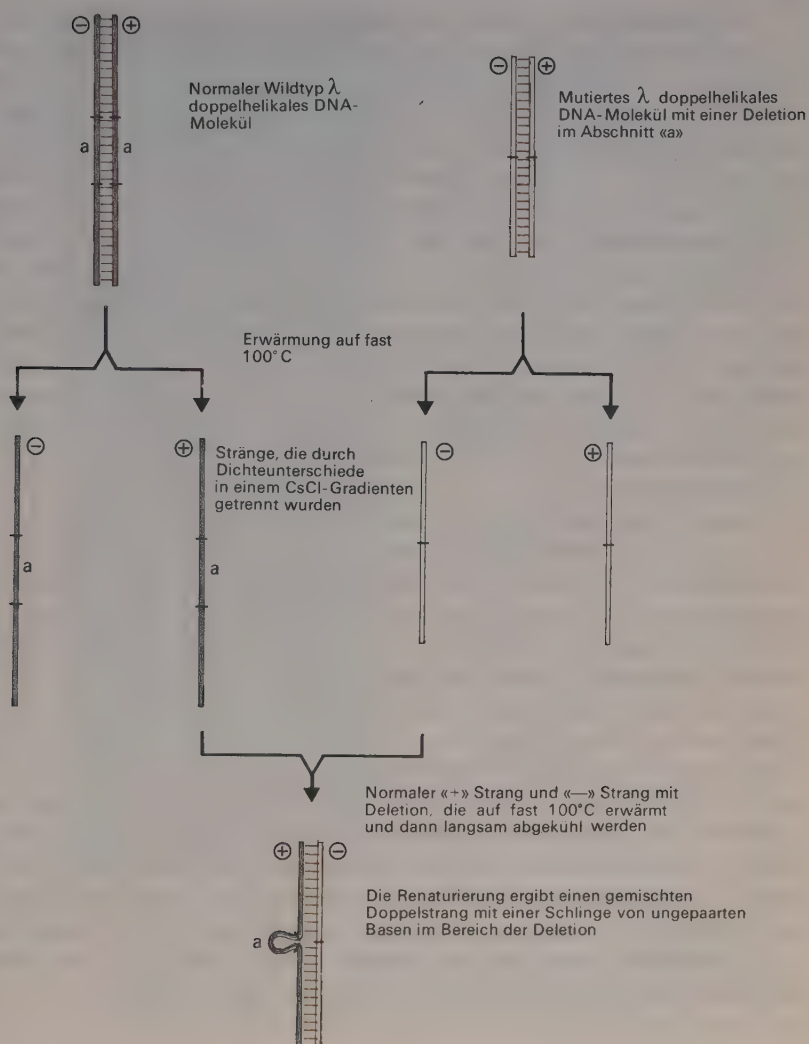


ABBILDUNG 10-6 Kartierung der Deletionen durch Darstellung renaturierter DNA-Moleküle im Elektronenmikroskop.

viel reicher an GC als die rechte ist. (Abbildung 15-9). Gereinigte linke und rechte Hälften können dann für DNA-Transformationsversuche verwendet werden, damit man sieht, welche Gene in jedem Fragment vorhanden sind. Das Resultat zeigt eine gute Übereinstimmung mit den linken und rechten Hälften der Genkarte.

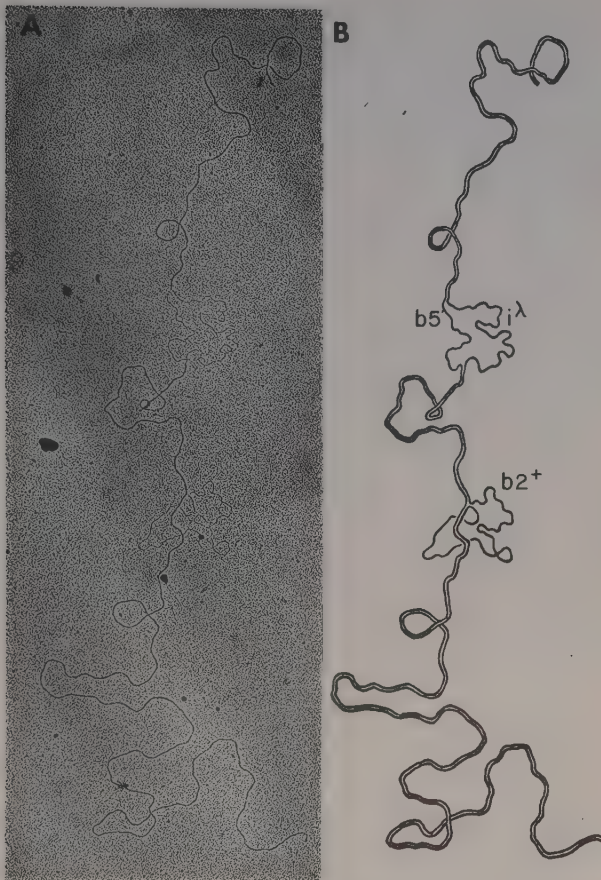
Viel genaure Daten stammen von der Kartierung gut bestimmter Deletionen einer großen Anzahl von Nukleotiden. Dies kann man durch die Methode der DNA-DNA Hybridisierung erreichen. Bei diesem Vorgang werden die beiden Stränge der  $\lambda$  Doppelhelix durch Erhitzen auf fast 100°C getrennt. Bei dieser Temperatur brechen praktisch alle Wasserstoff-Brückenbindungen, die das Molekül zusammenhalten, auf und die sich ergebenden freien Einzelstränge lösen sich durch Auseinanderwinden (DNA Denaturierung) voneinander. Die «+» und «—» Stränge können dann durch ihren Unterschied in der Dichte in einer CsCl Lösung voneinander getrennt werden. Die Neubildung von Doppelhelices aus getrennten einzelnen Strängen (Renaturierung) findet statt, wenn die einzelnen Stränge miteinander vermischt, auf fast 100°C erhitzt und dann langsam abgekühlt werden. Unter diesen Bedingungen bilden sich die ursprünglichen Wasserstoffbrücken zwischen den Komplementärsträngen wieder und die sich ergebenden Moleküle sind im Elektronenmikroskop von den Molekülen, die nie erwärmt wurden, nicht zu unterscheiden.

Wenn jedoch die Renaturierung zwischen einem normalen «+» Strang und einem «—» Strang stattfindet, der eine Deletion enthält, kann der Teil mit dem «+» Strang, der dem «—» Teil mit dem fehlenden Stück komplementär ist, keine Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen. Er bleibt als einsträngige Schlinge bestehen, die aus dem vorwiegend doppelsträngigen Molekül herausragt (Abbildung 10-6). Diese Schlingen sind im Elektronenmikroskop leicht zu erkennen (Abbildung 10-7) und erlauben so die präzise Lokalisierung einer Anzahl verschiedener Deletionen im  $\lambda$  DNA-Molekül. Wenn man diese Daten neben die sehr gut erforschte Genkarte von  $\lambda$  legt, erhält man das in Abbildung 10-8 gezeigte Bild. Es ergibt eine viel genauere Übereinstimmung zwischen der Genkarte und der tatsächlichen physikalischen Struktur der DNA als man vorhergesehen hatte. Man kann daher bei durchschnittlichem Auflösungsvermögen sagen, daß die Wahrscheinlichkeit des Crossing-over im ganzem DNA-Molekül ungefähr gleich ist. Ausnahmen dazu sind aus Abbildung 10-8 ersichtlich und man muß vorsichtig sein, in die Daten über genetische Kopplung nicht zu viel hineinzuinterpretieren.

#### **EIN DURCHSCHNITTLICHES GEN ENTHÄLT UMGEFÄHR 900 BIS 1500 NUKLEOTIDPAARE**

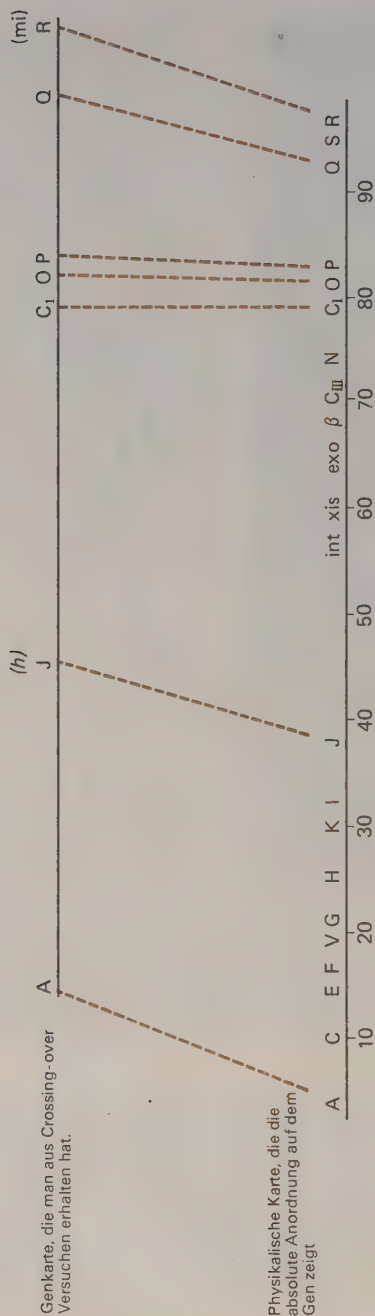
Es gibt verschiedene Methoden, zu diesem Ergebnis zu gelangen. Die direkteste teilt die Anzahl der Nukleotide in einem Chromosom durch die Zahl der Gene, die auf ihm liegen. Zum Beispiel sind bis jetzt mehr als 65 Gene auf den Chromosomen des Bakterienvirus T4 beschrieben. Das Chro-





**ABBILDUNG 10-7** Elektronenmikroskopische Aufnahme (links) einer Heteroduplex aus Strang I von  $\lambda$ - und Strang r von  $\lambda b2b5$ , zusammen mit einer erklärenden Zeichnung (rechts).  $\lambda b2b5$  enthält eine Deletion ( $b2$ ) und einen nicht homologen Teil ( $b5$ ), der sich mit seinem  $\lambda$  Gegenstück nicht paaren kann. (Wiedergabe mit Genehmigung von Westmoreland, Szybalski und Ris, Science, **163**, 1343, 1969.)

mosom hat ein Molekulargewicht von 120 Millionen, was ein durchschnittliches Molekulargewicht von 2 Millionen pro Gen ergibt. Das ist sicherlich ein oberer Schätzwert, da wahrscheinlich ein bedeutender Teil der T4 Gene noch nicht entdeckt ist. Im gründlicher erforschten Bakterienvirus  $\lambda$  wurden ungefähr 40 Gene kartiert. Da das Molekulargewicht seiner DNA 32 Millionen beträgt, ist die obere Grenze seiner durchschnittlichen Gengröße 0,8 Millionen.



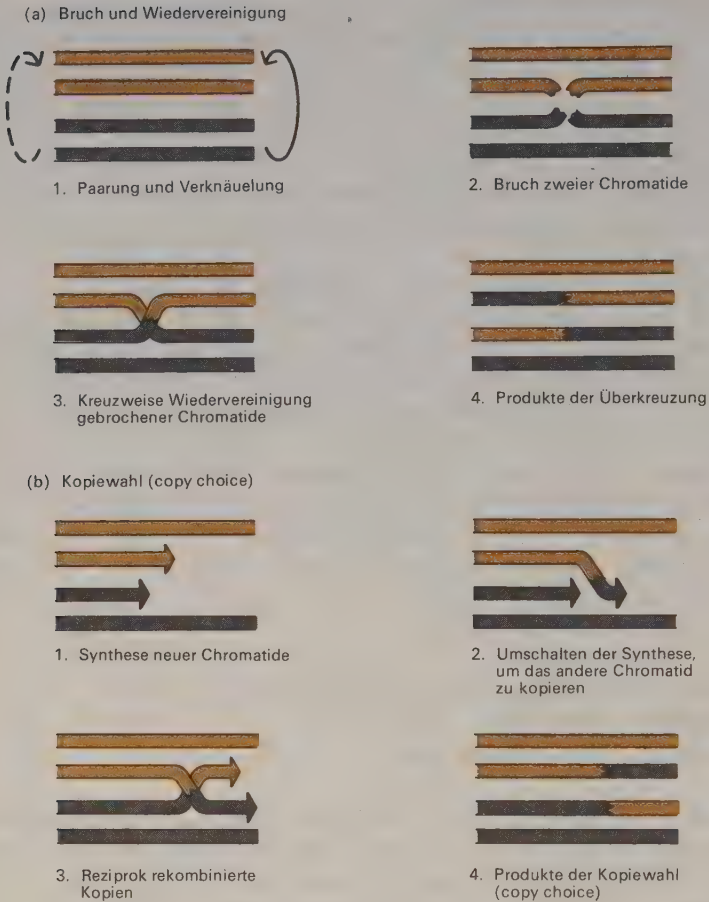
**ABBILDUNG 10-8** Vergleich der  $\lambda$  (Rekombinations)-karte mit der richtigen physikalischen Karte. Die Rekombinationskarte wurde nach Daten von Amai und Meselson, Genetics, 51, 369, 1965, gezeichnet, während die physikalische Karte auf einer neuen Karte von W. Szybalski (Universität von Wisconsin) beruht.

Ähnliche Größenbereiche ergeben sich aus Genkartierungsversuchen. Zum Beispiel nimmt das rIIA Gen von T4 ungefähr 1 Prozent der gesamten Genkarte ein (Abbildung 10-1). Wenn es von durchschnittlicher Größe ist, enthält T4 ungefähr 100 Gene. Die Gültigkeit dieser Methode hängt auch von der Annahme ab, daß Crossing-over in allen Bereichen des Chromosoms mit ungefähr gleicher Häufigkeit stattfindet. Wenn das nicht der Fall ist, scheinen Bereiche, in denen viel Crossing-over stattfindet, genetisch viel weiter voneinander entfernt zu sein, als Bereiche von an sich gleicher Größe, die nur begrenzt rekombinieren.

Unsere erste Argumentation ist schließlich die zwingendere, sie leidet aber unter der Schwierigkeit, daß nicht alle Gene in T4 und  $\lambda$  bekannt sind. Daher sollten wir die Geschwindigkeit, mit der noch immer neue Gene entdeckt werden, genau verfolgen. Derzeit sieht es so aus, als ob sich die Zahl für T4 und  $\lambda$  höchstens noch verdoppeln würde (die Geschwindigkeit der Entdeckungen, besonders für  $\lambda$ , verlangsamt sich zusehends). Daher könnte die durchschnittliche Gengröße zwischen einer halben und einer Million liegen, je nach dem Organismus, der erforscht wird. Da das Molekulargewicht eines Basenpaares etwas über 600 liegt, bedeutet das, daß ein durchschnittliches Gen aus der linearen Anordnung von ungefähr 900 bis 1500 Basenpaaren besteht.

#### **CROSSING-OVER BERUHT AUF SPALTUNG UND WIEDERVEREINIGUNG VON INTAKTEN DNA-MOLEKÜLEN**

Bis vor kurzer Zeit hatte man nicht einmal ein oberflächliches Verständnis für die molekulare Basis des Crossing-over. Das klassische Bild des Crossing-over, wie es in den 30er Jahren nach zytologischen Beobachtungen entwickelt wurde, regte die Hypothese an, daß die gepaarten, zusammengeknäuelten Chromosomen während der Meiose manchmal im Zustand des Chromatids als Folge der Spannung, die durch ihre Kontraktion entstand, gebrochen wurden. Die aufgebrochenen Enden konnten dann die Spannung durch kreuzweise Wiederverbindung abbauen, wobei zwei reziprok rekombinierte Chromatide sowie zwei Elternchromatide entstanden (Abbildung 10-9). Nach diesem Modell findet die Rekombination statt, nachdem die Chromosomenverdoppelung abgeschlossen ist - d.h. im viersträngigen Zustand. Diese Hypothese geriet ungefähr 1955 in Mißkredit, als Genetiker herausfanden, daß Crossing-over innerhalb des Gens stattfand, welches nunmehr als Teil des DNA-Moleküls erkannt war. Eine anscheinend unangenehme Folge war, daß die wirkamen Bruchstellen notwendigerweise in den zwei homologen Chromatiden zwischen den gleichen Nukleotiden liegen mußten. Sonst würde die Rekombi-



**ABBILDUNG 10-9** Schematische Darstellung von zwei möglichen Mechanismen des Crossing-over.

bination neue DNA-Moleküle ergeben, die in der Länge von den Elternmolekülen abweichen.

Um diese Probleme zu vermeiden, setzte sich eine Hypothese durch, die die Rekombination mit der Chromosomenverdoppelung in Zusammenhang brachte. Diese alternative Hypothese schlug vor, daß der neue DNA Strang, der (zum Beispiel) auf dem väterlichen Chromosom gebildet wird, während der Replikation der gepaarten Chromosomen zu dem mütterlichen hinüberwechselt, den er daraufhin kopiert. Wenn das Komplementärstück des mütterlichen Stranges ebenfalls die Matrizen vertauscht, wenn es den gleichen



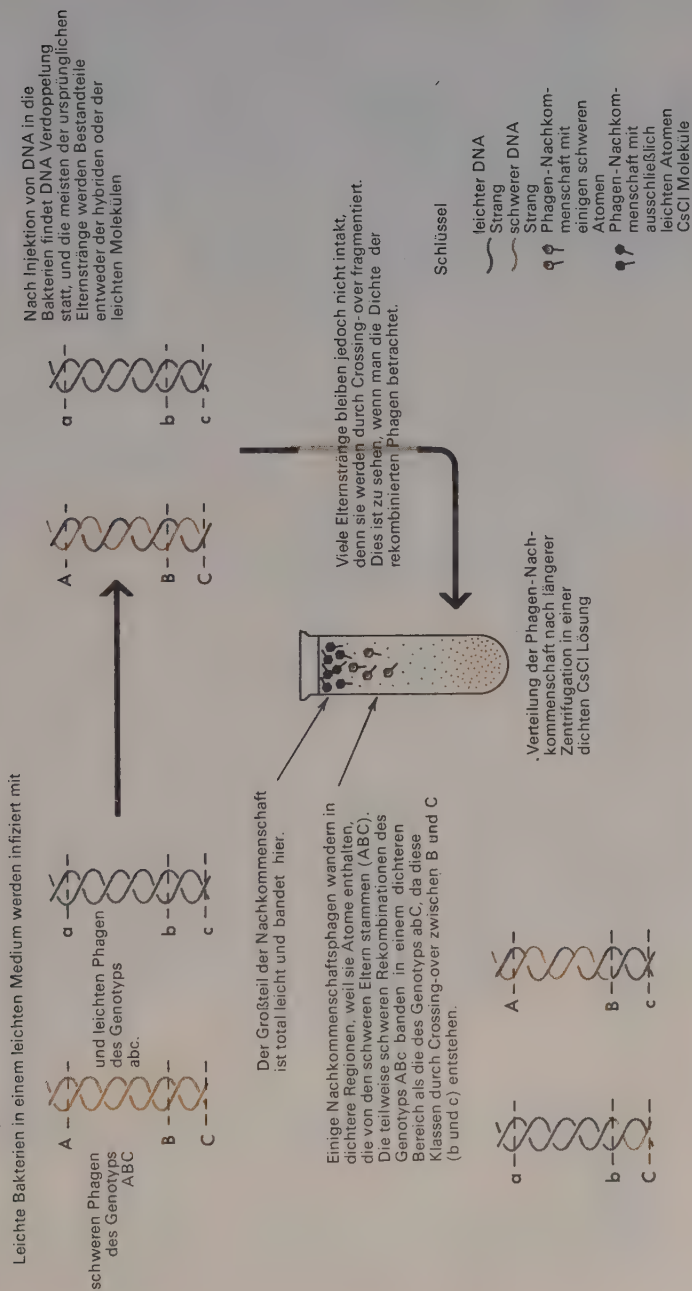
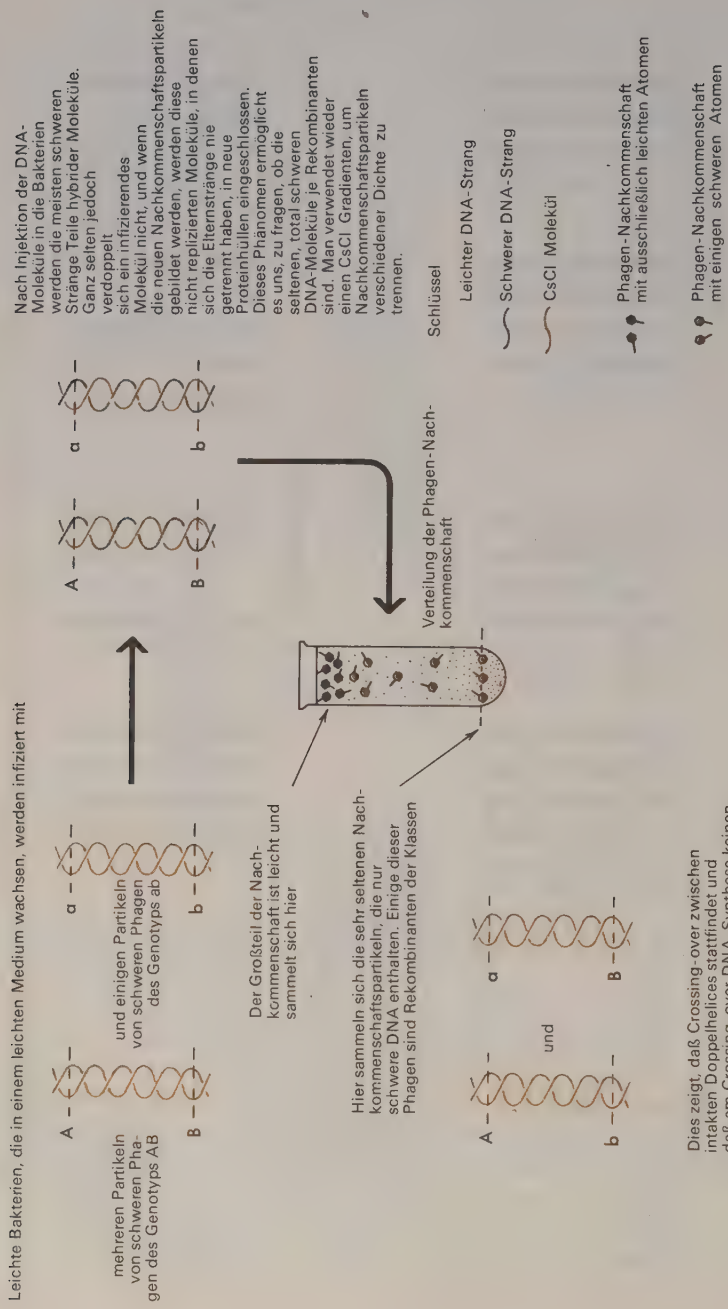


ABBILDUNG 10-10 Die Verwendung schwerer Isotope, um den Mechanismus des Crossing-over zu untersuchen.



Dies zeigt, daß Crossing-over zwischen intakten Doppelhelices stattfindet und daß am Crossing-over DNA-Synthese keinen nennenswerten Anteil hat.

**ABBILDUNG 10-11** Der experimentelle Beweis, daß Crossing-over und DNA Verdoppelung unabhängige Phänomene sind.

Punkt erreicht, würden zwei reziprok rekombinierte Stränge gebildet werden. Dieser hypothetische Prozeß wird *Kopiewahl* (copy choice) genannt. Zwischen den beiden Hypothesen besteht ein fundamentaler Unterschied in der Voraussage des physischen Ursprungs der rekombinierten Chromosomen. Nachdem sie gebrochen und wieder vereinigt sind, erben die rekombinierten Chromosomen Material von den zwei Elternchromosomen. Im Gegensatz dazu werden die rekombinierten Chromosomen, die durch copy choice erzeugt werden, aus neuem Material synthetisiert.

Diese alternativen Hypothesen wurden in letzter Zeit durch Versuche mit parental  $\lambda$ -Phagenpartikeln, die mit den schweren Isotopen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert waren, überprüft (Abbildungen 10-10 und 10-11). Hier wurden wiederum die schweren Isotopen verwendet, damit ein Caesiumchloridgradient Eltern- und Tochterstränge der DNA unterscheiden konnte. In *E. coli* Zellen, die in einem leichten  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  Medium wuchsen, wurden genetische Kreuzungen zwischen schweren (oder zwischen schweren und leichten) Phagenpartikeln vorgenommen. Unter diesen Bedingungen stammen alle neu synthetisierten viralen DNA-Moleküle von den leichten Vorstufen ab; somit sollten, falls copy choice der korrekte Mechanismus ist, alle rekombinierten Partikeln leicht sein. Wenn hingegen die Rekombinanten durch Bruch und Wiedervereinigung entstehen, werden einige der rekombinierten Phagenpartikeln schwere Atome erhalten, die von den Elternchromosomen abstammen. Die Nachkommenschaft dieser Kreuzungen wurde in dichte CsCl Lösungen getan und hochtourig zentrifugiert, um Partikeln verschiedener Dichte zu trennen. Phagenpartikeln verschiedener Dichte wurden dann gesammelt und genetisch überprüft, um zu sehen, welche Rekombinanten waren. Die experimentellen Ergebnisse (Abbildung 10-10) waren eindeutig und zeigten zur Überraschung der meisten Molekularbiologen, daß einige rekombinierte Partikeln schwere Atome enthielten. Weitere Versuche (Abbildung 10-11) ergaben darüber hinaus, daß Rekombination zwischen sich nicht replizierenden DNA-Molekülen stattfinden kann. Bruch und Wiedervereinigung von intakten Doppelhelices muß daher der hauptsächliche Mechanismus des Crossing-over in Bakteriophagen sein. Crossing-over in Bakterien und auch in höheren Organismen wird sehr wahrscheinlich eine ähnliche Grundlage haben.

## DIE ROLLE SPEZIFISCHER ENZYME BEI DER REKOMBINATION

Die neuesten Versuche, die genaue Art und Weise aufzuklären, auf die sich die Stränge wieder vereinigen, basieren auf zwei Annahmen. Die erste Annahme besteht darin, daß zwei homologe doppelhelikale DNA-Moleküle einander an spezifischen Punkten nicht anziehen. Man kann sich keine

offensichtliche Paarungskraft vorstellen. Die zweite Annahme ist, daß die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen komplementären Bereichen einsträngiger Ketten an dem Erkennungsvorgang beteiligt ist.

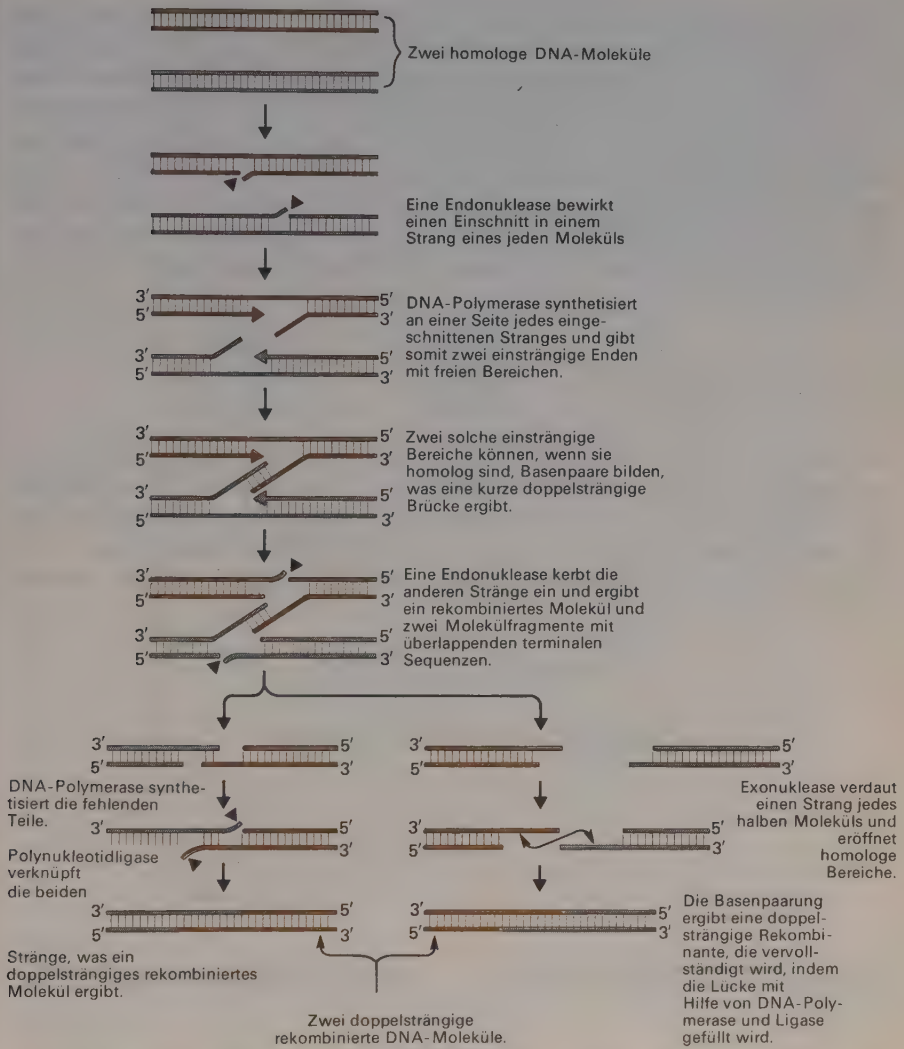
Eine Art, auf die einsträngige Bereiche entstehen könnten, beginnt mit einem Einschnitt im Einzelstrang durch eine Endonuklease. Dies erzeugt freie Enden, an die die DNA-Polymerase neue Nukleotide anfügen kann, wodurch die schon vorhandenen Stränge weggeschoben werden, um eine Anzahl einsträngiger Enden zu bilden (Abbildung 10-12). Das zufällige Zusammentreffen der Enden mit Komplementärsequenzen führt zu der Bildung doppelhelikaler Verzweigungen zwischen verschiedenen DNA-Molekülen. Wenn darauffolgende Endonukleaseschnitte auftreten, wie sie in Abbildung 10-12 gezeigt werden, und die Lücke daraufhin geschlossen wird, wird zusätzlich zu zwei Molekülfragmenten ein rekombiniertes DNA-Molekül erzeugt. Der Angriff der Endonuklease auf die verbleibenden Fragmente erzeugt dann die komplementären einsträngigen Bereiche (Abbildung 10-12), die notwendig sind, um ihre Verbindung zu bewerkstelligen. Die Lücken in den einzelnen Strängen können dann durch ein Enzym mit der Spezifität der DNA-Polymerase geschlossen werden. Das Endergebnis ist ein zweites rekombiniertes Molekül, dessen genetische Struktur im wesentlichen der der ersten Rekombinante reziprok ist.

Sichere Beweise, daß Nukleasen an der Rekombination beteiligt sind, ergeben sich aus Untersuchungen an den Phagen T4 und  $\lambda$ . Wenn sie sich vervielfältigen, findet viel mehr Crossing-over statt als in entsprechend langen Stücken von *E. coli* DNA festzustellen ist. Gleichzeitig tauchen mehrere Virus-spezifische Nukleasen auf. Jede wird auf dem Viruschromosom durch ein spezifisches Gen codiert (siehe Kapitel 15). Bei der Infektion mit T4 wurden bis jetzt sowohl eine Virus-spezifische Endonuklease als auch ein neues Enzym mit einer DNA-Polymerase-artigen Spezifität entdeckt, während die Infektion mit  $\lambda$  durch das Auftreten neuer Exonuklease- und Endonuklease-Aktivität gekennzeichnet ist. Am wichtigsten ist, daß Mutationen, die die Synthese der  $\lambda$  Exonuklease blockieren, auch die Rekombinationszunahme, die normalerweise mit der Infektion durch  $\lambda$  Hand in Hand geht, blockieren.

#### **STABILISIERUNG GESTRECKTER EINSTRÄNGIGER ENDEN DURCH EIN DIE REKOMBINATION FÖRDERNDES PROTEIN**

Offensichtlich im Widerspruch zu obiger Theorie steht die starke Tendenz aller bekannter einzelner DNA-Stränge, durch Wasserstoffbrücken gebundene haarnadelartige Schlingen zu bilden, wie man sie bei einsträngigen RNA-Ketten antrifft (siehe Kapitel 11). Außerhalb der Zelle liegt bei 37°C





**ABBILDUNG 10-12** Hypothese, daß Crossing-over mit der Paarung von komplementären einsträngigen Enden beginnt, die aus doppelhelikalen DNA-Molekülen herauswachsen.

die Mehrzahl der Basen einsträngiger DNA in durch Wasserstoffbrücken gebundenen Schlingen vor (Abbildung 11-11), die normalerweise nur aufbrechen, wenn die Temperatur auf über 50°C erhöht wird. Daher fanden es viele kaum glaublich, daß freie gestreckte einsträngige DNA-Ketten häufig

in Zellen auftreten. Doch dieses Problem löste sich mit der kürzlich erfolgten Entdeckung eines Proteins, das, indem es sich fest an eine einsträngige DNA bindet, die haarnadelartigen Schlingen öffnet. Die sich daraus ergebenden gestreckten Polynukleotidketten werden dadurch sofort in die einfache Lage versetzt, Doppelhelices zu bilden, wenn sie mit einem ähnlichen gestreckten Strang von komplementären Sequenzen zusammenstoßen. Neben seiner Beteiligung an der Rekombination scheint das Protein auch bei der DNA-Replikation eine wichtige Rolle zu spielen - möglicherweise die, die einsträngigen Bereiche an den Wachstumsgabeln in der gestreckten Form, die für die Matrizenfunktion notwendig ist, zu erhalten.

### HETERODUPLICES

Das stärkste Argument für die Hypothese, daß das grundlegende Rekombinationsereignis die Paarung einsträngiger Enden mit sich bringt, ist die Existenz von Segmenten, die als Heteroduplex vorliegen. Dies sind Bereiche, wo die zwei Stränge nicht genau komplementär sind. Sie entstehen, wenn der Paarungsbereich die Stelle (oder Stellen) genetischer Unterschiede zwischen

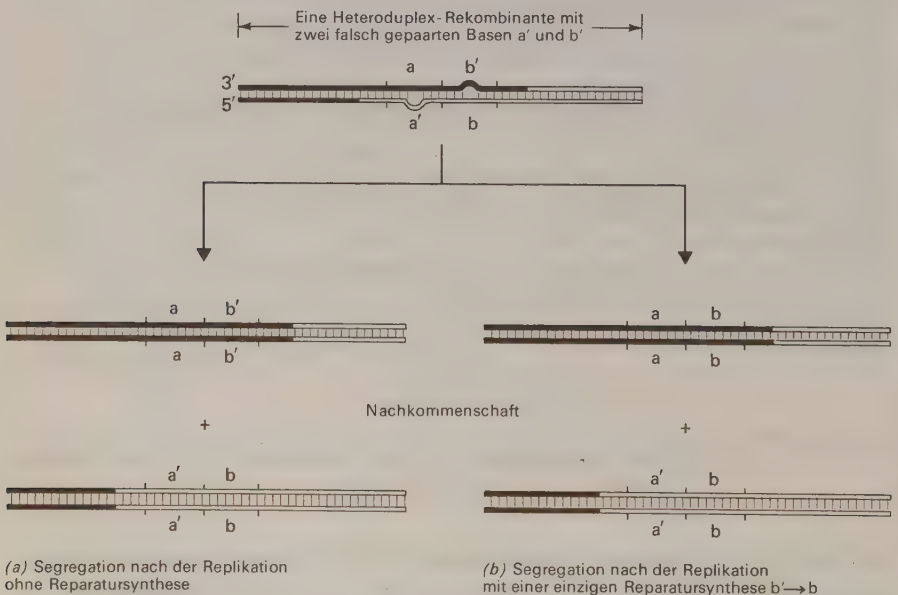
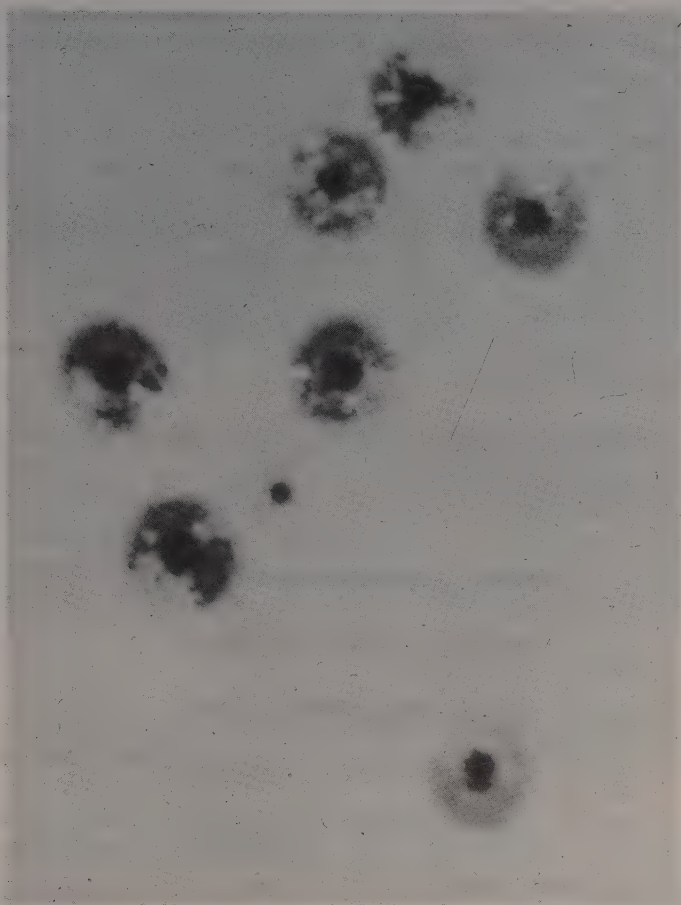


ABBILDUNG 10-13 Segregation der Heteroduplex mit und ohne Reparatursynthese.



**ABBILDUNG 10-14** *Aufnahmen mehrerer gemischter Plaques, die durch die Segregation einer DNA-Heteroduplex entstehen, die sowohl rII<sup>+</sup> als auch rII Marker auf gegenüberliegenden Strängen enthält. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. D. Hershey.)*

den zwei parentalen Chromosomen einschließt. Wir haben Beweise, daß Heteroduplex-Bereiche in allen Viren auftreten, deren Genetik intensiv erforscht wurde. Im Durchschnitt gibt es auf jedem T4-DNA-Molekül einen solchen, der mehrere tausend Nukleotide lang ist. Heteroduplices wurden auch in  $\lambda$  Phagen gut dargestellt und sind wiederum viel länger als man zuerst vermutete. Daher sollten die sich kreuzenden Enden lang genug sein, um im Elektronenmikroskop sichtbar zu werden. Es ist denkbar, daß dies sehr bald der Fall sein wird.

Die Lebensdauer einer Heteroduplex ist für gewöhnlich sehr kurz, da die alternativen Allele segregieren (Abbildung 10-13), wenn sich die rekombinierten DNA-Moleküle verdoppeln. Dies wurde zuerst in Systemen von Phagen beobachtet, wo die bloße Betrachtung rekombinierter Plaques Mischungen von zwei genetisch distinkten Arten ergibt. Wenn die DNA einer parentalen T4-Phagenpartikel eine rII-Heteroduplex-Region enthält, hat der sich ergebende Plaque ein gemischtes Aussehen; einige Teile sind charakteristisch für den rII-Phänotyp, andere für den Wildtyp-r<sup>+</sup> Phänotyp (Abbildung 10-14).

### DIE REKOMBINATION AM ORT DES CROSSING-OVER IST NICHT IMMER REZIPROK

Frühe Untersuchungen von Crossing-over zwischen verschiedenen Genen ergaben das anscheinend obligatorische Auftreten von reziproken Rekombinanten (Abbildung 10-15). Man entdeckte jedoch Ausnahmen von dieser

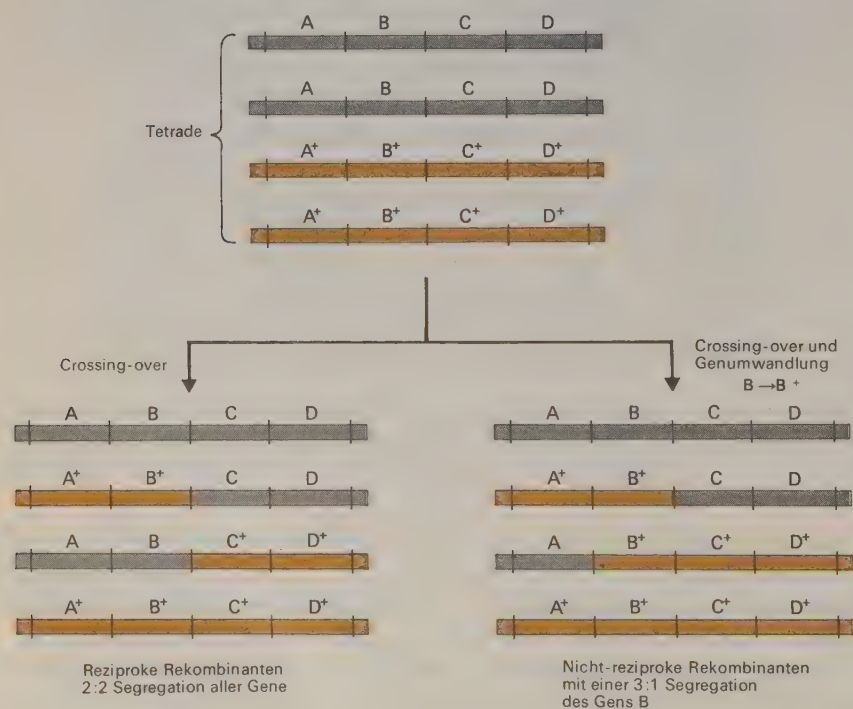


ABBILDUNG 10-15 Reziproke und nicht-reziproke Rekombination nach Crossing-over.



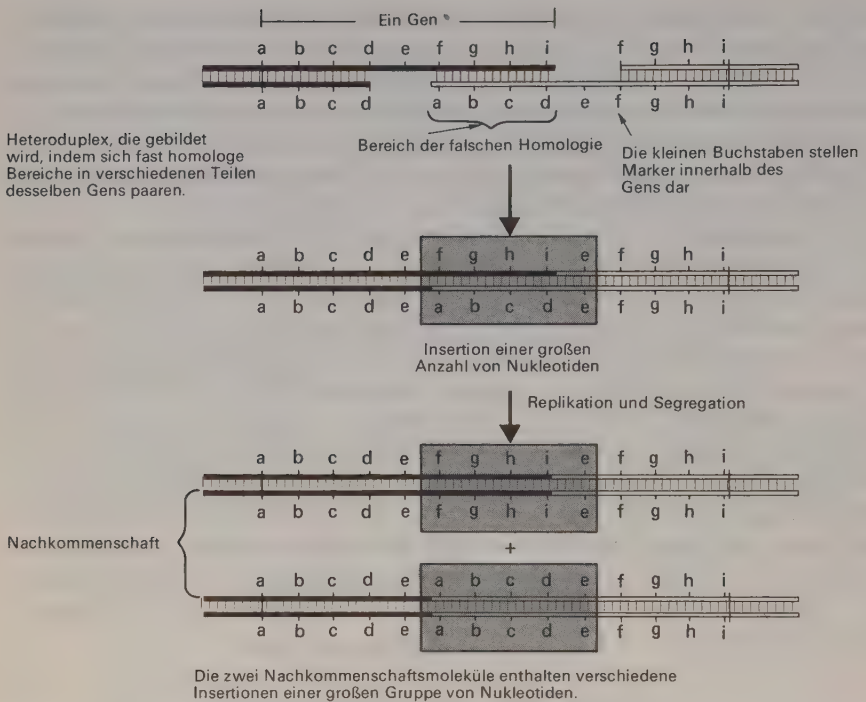
Regel, als man die Rekombinanten erforschte, die zwischen nahe beieinander gelegenen Stellen im selben Gen entstanden. In diesem Fall war oft nicht-reziprokes Verhalten zu beobachten. Dieses Phänomen, das man «Genumwandlung» nennt, ist am besten in jenen Organismen zu beobachten, wo alle Produkte eines einzigen meiotischen Vorganges zu sehen sind, wie in Hefe oder *Neurospora*. Hier sind Fälle von 3:1 Segregationen der eingehenden Allele zu finden, statt der immer gleichen (2:2) Segregation.

Die Hypothese des Crossing-over, wie sie oben erklärt wurde, erlaubt solche Ausnahmen. Dies wird in Abbildung 10-13 gezeigt, wo das endgültige Segregationsmuster der Gene, die in der Umgebung der Crossing-over-Stelle liegen, durch Reparaturprozesse beeinflusst werden könnte, die die Heteroduplex-Verzerrungen in der Doppelhelix erkennen und willkürlich eine Base aus einem falsch gepaarten Basenpaar entfernen. Je nach der entfernten Base sind entweder 2:2 oder 3:1 Verhältnisse zu finden. Wir wissen heute noch nicht, welcher Anteil der Genumwandlung tatsächlich auf die Reparatursynthese zurückzuführen ist. Andere Erklärungen ziehen eine Reihe komplizierter Endonuklease- und Exonukleaseschnitte während der Rekombination heran, die ebenso gestörte Segregationsmuster erzeugen könnten. Im großen Ganzen gesehen ist jedoch das Außergewöhnlichste an der Rekombination - sogar auf molekularer Ebene - das Vorherrschen der reziproken Rekombinanten.

#### INSERTIONEN (DELETIONEN), DIE DURCH IRRTÜMER BEIM CROSSING-OVER ENTSTEHEN

Die ungeheure Genauigkeit der meisten Crossing-over Vorgänge hängt von der richtigen Gegenüberstellung der komplementären einsträngigen Bereiche während der Neubildung der Wasserstoff-Brückenbindungen ab. Dies ergibt sich aus der Einmaligkeit der meisten langen Nukleotidsequenzen. Wenn eine willkürliche Kette von Polynukleotiden mehr als 12 Nukleotide enthält, wird sie praktisch nie die gleiche Sequenz haben wie ein anderes Fragment ähnlicher Länge. Solange die einsträngigen Segmente relativ lang sind, ist es daher äußerst unwahrscheinlich, daß ein Fragment eines Gens fälschlich mit dem falschen Teil seines eigenen Gens oder eines anderen Gens verbunden wird. In jenen seltenen Fällen, wo zwei verschiedene Bereiche beträchtliche Homologie aufweisen, muß man jedoch gelegentliche Fehlverbindungen erwarten, die zu Insertion (Deletion) großer Blöcke von Nukleotiden führen (Abbildung 10-16).

Deletionen einzelner Basenpaare sind die Folgen von falschen Paarungen, wie der in Abbildung 10-17 rechts gezeigten. Die sich ergebende Doppelhelix hat zwei falsch gepaarte Basen, die, wenn sie nicht durch irgendeinen Repara-



**ABBILDUNG 10-16** *Ursprung einer Insertion von vielen Nukleotiden durch die Paarung fast homologer Sequenzen innerhalb desselben Gens.*

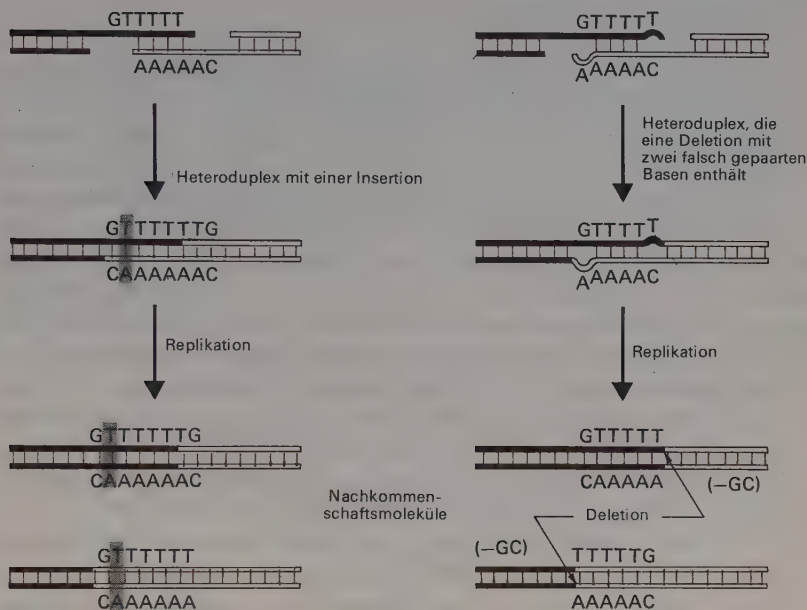
turvorgang berichtet werden, zwei Nachkommenschaftshelices erzeugen, von denen jede eine verschiedene Deletion eines Nukleotidpaares enthält. Wenn die Paarung dagegen wie links in Abbildung 10-17 stattfindet, sind zwei Nachkommenschaftshelices, jede mit der gleichen Insertion eines einzigen Basenpaares das Endergebnis.

Bei T4 erscheint es wahrscheinlich, daß die meisten Insertionen (Deletionen) durch Crossing-over entstehen. Im Gegensatz dazu findet bei der normalen Replikation von *E. coli* viel weniger Crossing-over statt; so ist die Häufigkeit der Mutationen durch Insertionen (Deletionen) viel geringer als beim T4.

## HOT SPOTS SIND OFT STELLEN FALSCHER PAARUNG

Das folgende Modell impliziert, daß die Wahrscheinlichkeit, daß eine Insertion (Deletion) stattfindet, von der umliegenden Basensequenz abhängt. Je

Falsche Paarung eines homologen Bereiches mit 5A und 5T



(a) Die Segregation der Rekombinante ergibt zwei Moleküle mit identischen AT Insertionen.

(b) Die Segregation der Rekombinante ergibt zwei Moleküle, die je eine verschiedene GC Deletion enthalten.

**ABBILDUNG 10-17** Der mögliche Ursprung von Deletionen und Insertionen während des Crossing-over durch falsche Paarung von Bereichen, die Strecken identischer Basen enthalten.

länger die Strecke der sich wiederholenden Basen, desto höher ist die Häufigkeit der Mutation. Beweise, die diese Hypothese stützen, ergaben sich aus Untersuchungen des T4-spezifischen Enzyms Lysozym, das durch die T4-DNA codiert wird. Daten der Nukleotidsequenzen, die man mit Insertions- und Deletionsversuchen erhalten hat, wie jene, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden, lassen schließen, daß eine äußerst mutationsfähige Stelle (hot spot) die Deletion eines A auf einer Strecke von 6 A Resten mit sich bringt. Die Rückmutation, bei der ein zusätzliches A sich an einen 5A Bereich anfügt, findet mit 100-fach geringerer Häufigkeit statt. Somit ist die Häufigkeit der Insertions- (Deletions-) Mutation höchstwahrscheinlich äußerst stark von der Anzahl identischer, sich wiederholender Basen (Basendubletten, etc.) abhängig.

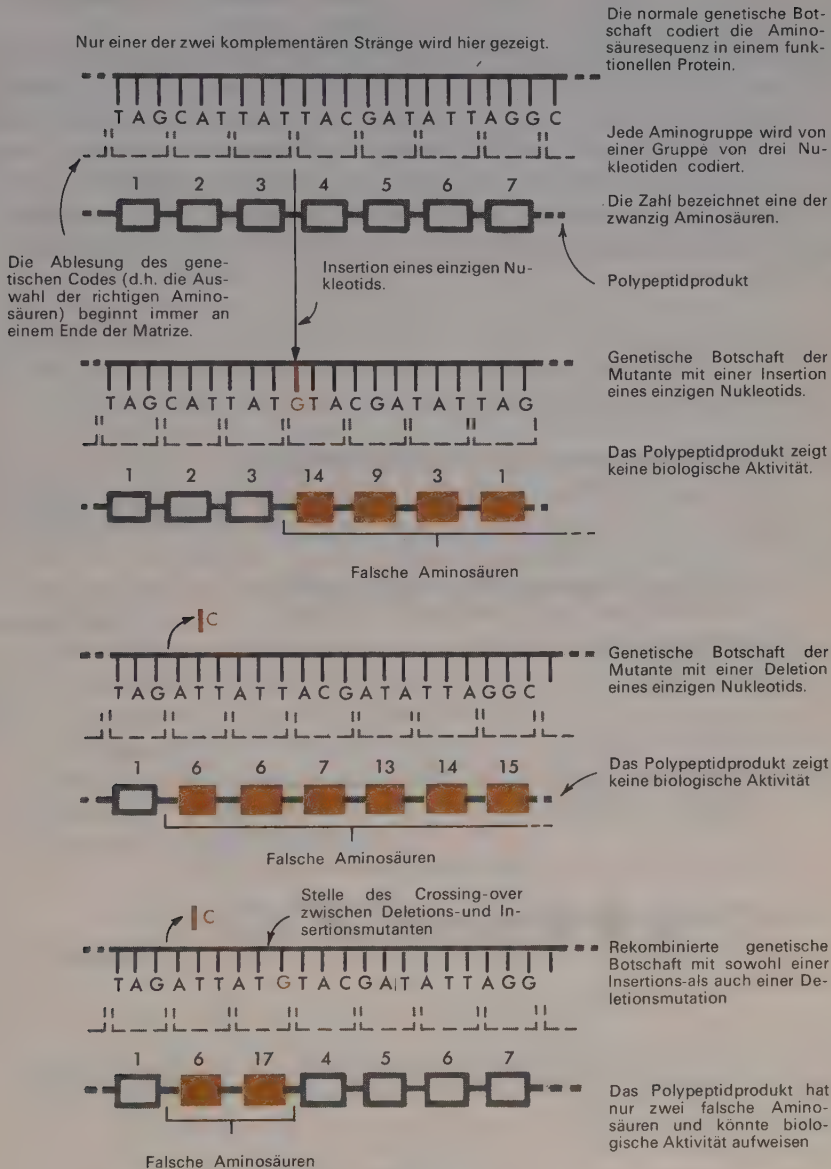
### DER GENETISCHE CODE WIRD IN DREIERGRUPPEN GELESEN

Eine offensichtliche Folge der Tatsache, daß es 20 Aminosäuren und nur 4 Basen gibt, ist, daß jede Aminosäure durch eine Gruppe von Nukleotiden codiert werden muß. Es kann keine eins-zu-eins Korrespondenz zwischen den Basen der DNA und den Aminosäuren bestehen. Es gibt genetische Beweise, daß Gruppen von jeweils drei Nukleotiden Grundeinheiten darstellen und daß der Code linear gelesen wird, wobei man an einem Ende beginnt. Diese Resultate ergeben sich aus Kreuzungen zwischen Mutanten mit Deletionen oder Insertionen von einem oder mehreren Nukleotiden. Mutationen, die auf Deletionen oder Insertionen zurückzuführen sind, führen für gewöhnlich zu völlig funktionslosen Genen. Im Gegensatz dazu führt ein einfacher Basenaustausch oft zu «durchlässigen» (leaky) Genen, in denen das mutierte Protein teilweise enzymatische Aktivität hat, da eine einzige Aminosäure ausgetauscht wurde. Das praktisch vollständige Fehlen enzymatischer Aktivität in den Deletions- (Insertions-) Mutanten lehrt uns, daß ihr Proteinprodukt völlig verändert ist.

Dieser auffallende qualitative Unterschied ergibt sich aus der Tatsache, daß während der Proteinsynthese die Ablesung des genetischen Codes an einem Ende der Matrize für das Protein beginnt und in aufeinanderfolgenden Blöcken von drei Basen vor sich geht. Das Resultat ist, daß, falls eine Deletion oder Insertion vorkommt, der Raster vollständig durcheinander gebracht wird (Abbildung 10-18). Wenn, zum Beispiel, normalerweise die Gensequenz ATTAGACAG... als (ATT), (AGA), (CAC), ... gelesen wird, dann führt die Insertion eines neuen Nukleotids ATTCAGACAC... zur Ablesung in den folgenden Gruppen: (ATT), (CAG), (ACA), (C..). Eine ähnliche Folge ergibt sich aus einer Deletion. Die Kreuzung zweier Deletions- (oder zweier Insertions-) Mutanten ergibt Doppelmutanten, in denen der Raster noch immer verschoben ist.

Teilweise aktive Gene können jedoch durch Crossing-over zwischen einer Insertion und einer nahegelegenen Deletion erzeugt werden. Crossing-over zwischen der Deletion und der Insertion stellt den korrekten Raster wieder her, außer in dem Bereich zwischen Deletion und Insertion (Abbildung 10-18). Wenn das resultierende Proteinprodukt bis auf einige ausgetauschte Aminosäuren normal ist, kann es eine gewisse enzymatische Aktivität besitzen. Manchmal ist es auch möglich, funktionelle Gene zu erhalten, indem man Rekombinanten herstellt, die drei Insertionen (Deletionen) in geringem Abstand voneinander enthalten. Rekombinanten mit vier nahe beieinander gelegenen Insertionen (Deletionen) ergeben jedoch nur völlig inaktive Proteine. Diese zwei letztgenannten Versuche lehren uns, daß die Ablesegruppe drei Nukleotide enthält, da der Raster mit Ausnahme des

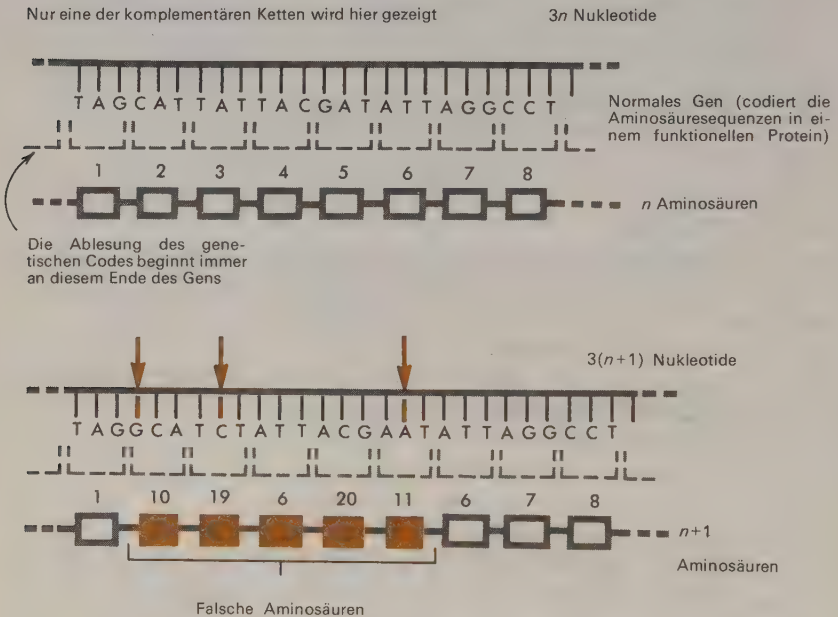




**ABBILDUNG 10-18** Die Wirkung von Mutationen, bei denen eine Base hinzugefügt wird oder verloren geht, besteht darin, die Ablesung der genetischen Botschaft zu verändern.

Bereiches mit der Deletion (Insertion) wiederhergestellt wird, wenn man drei Deletionen (Insertionen) verbindet (Abbildung 10-19).

Daher ist ein durchschnittliches Gen, das 900 Nukleotidpaare enthält, in 300 Leseeinheiten unterteilt, von denen jede einzelne eine einzige Aminosäure codiert. Dies stimmt sehr gut mit der durchschnittlichen Größe der bekannten Proteine überein, die bei 30.000 (300 Aminosäuren) liegt. Da jede Schätzung (durchschnittliche Gengröße und durchschnittliche Proteingröße) einen Unsicherheitsfaktor von 50 bis 100 Prozent enthält, ist dieses Ausmaß der Übereinstimmung fast besser als für den experimentellen Beweis notwendig ist.



Die Polypeptidkette enthält vier falsche Aminosäuren; ihre Kette wird durch eine Aminosäure verlängert. Sie kann eine gewisse biologische Aktivität aufweisen, je nachdem, wie die fünf falschen Aminosäuren ihre 3-D-Struktur beeinflussen.

**ABBILDUNG 10-19** Die Auswirkung des Einschubs von drei Nukleotidpaaren auf die Ablesung des genetischen Codes. Wenn die drei Nukleotide nahe beieinander eingeschoben werden, gerät die genetische Botschaft nur in einem kurzen Bereich durcheinander. Das gleiche Resultat erhält man, wenn drei nahe beieinander liegende Nukleotide verloren gehen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die genetische Information eines DNA-Moleküls hat ihren Sitz in der linearen Sequenz der vier Basen. Theoretisch kann eine äußerst große Zahl von verschiedenen Sequenzen vorhanden sein, da die Anzahl der möglichen Permutationen  $4^n$  ist, wobei  $n$  die Anzahl der Nukleotide auf einer DNA-Kette ist. Alle Mutationen bringen Veränderungen in der Sequenz der Basenpaare mit sich. Viele Mutationen bestehen im Austausch eines einzelnen Basenpaares an einer bestimmten Stelle, während andere entweder Insertionen oder Deletionen eines oder vieler Nukleotidpaare betreffen. Der Ersatz eines einzigen Basenpaares durch ein anderes rührt oft von Fehlern bei der Bildung normaler Wasserstoffbrücken während der Replikation her, während Insertions- oder Deletionsvorgänge häufig mit Fehlern beim Crossing-over zusammenhängen.

Die meisten Nukleotide auf einem DNA-Molekül umfassen Gene, die spezifische Polypeptidketten codieren. Der Abstand zwischen dem Ende eines Gens und dem Beginn des benachbarten kann sehr kurz sein, manchmal nur einige Nukleotide lang. Die meisten DNA-Moleküle enthalten eine große Anzahl von Genen, von denen jedes einzelne für gewöhnlich 600 bis 1800 Nukleotide enthält. Da Gruppen von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden eine einzige Aminosäure codieren, sind die meisten Polypeptide aus 200 bis 600 Aminosäuren zusammengesetzt.

Crossing-over entsteht durch Bruch und Wiedervereinigung doppelsträngiger DNA-Moleküle. Es hängt nicht direkt mit der Replikation zusammen und muß durch spezielle, spaltende Enzyme vermittelt werden, die lange Segmente einsträngiger DNA freilegen. Die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen diesen einsträngigen Bereichen von DNA kann zu der Bildung von rekombinierten Molekülen führen. Die meisten molekularen Vorgänge beim Crossing-over sind noch unbekannt.

## LITERATUR

- Benzer, S., «The Fine Structure of the Gene». Ein sehr klarer Artikel in *Scientific American* von 1962, nachgedruckt in *The Molecular Basis of Life*, S. 130, R. H. Haynes und P. C. Hanawalt (Eds.). Freeman, San Francisco, 1968.
- Stahl, F., *The Mechanics of Inheritance*, 2. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1969. Mutation und Rekombination, wie sie von einem der hervorragendsten Forscher auf dem Gebiet des Phagen gesehen werden. Besonders wertvoll sind die Fragen, die jedem Kapitel angefügt sind.
- Swanson, C. P., T. Merz und W. J. Young, *Cytogenetics*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1967. Eine kurze Einführung in die vielen zytologischen Fakten, die zur Interpretation der Rekombinationsversuche in höheren Organismen notwendig sind.

- Whitehouse, H. K. L., *Toward an Understanding of the Mechanism of Heredity*, 2. Aufl., Edward Arnold, London, 1969. Die vollständigste Abhandlung über den Mechanismus des Crossing-over, die zu finden ist.
- Meselson, M., und J. J. Weigle, «Chromosome Breakage Accompanying Genetic Reconstruction in Bacteriophage», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **47**, 857-868 (1961). Eine klassische Arbeit, die den Molekularbiologen zeigte, daß Chromosomen während des Crossing-over brechen.
- Strauss, B., «DNA Repair Mechanisms Related to Mutation and Recombination», in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Bd. 44, Springer, Berlin, 1968. Eine Übersicht, die sowohl genetische als auch biochemische Daten betont.
- Emerson, S., «Linkage and Recombination at the Chromosomal Level», in *Genetic Organization*, E. W. Caspari und A. W. Ravin (Eds.), Academic, New York, 1969. Der erste gründliche Übersichtsartikel, der die Genumwandlung im Zusammenhang mit DNA Reparaturprozessen analysiert.
- Crick, F. H. C., «The Genetic Code», *Sci. Am.*, Oktober, 1962, S. 66-74. Eine Beschreibung der ursprünglichen Rasterverschiebungsversuche von Crick und Brenner mit dem Phagen T4, die ergaben, daß der genetische Code in Gruppen von drei Nukleotiden abgelesen wird. Nachgedruckt in *The Molecular Basis of Life*, S. 198, R. H. Haynes und P. C. Hanawalt, (Eds.), Freeman, San Francisco, 1968.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi und M. Inoye, «Frameshift Mutation and the Genetic Code», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 77 (1966). Ein äußerst eleganter Beweis für die Rasterverschiebungshypothese aufgrund von Aminosäuresequenzanalysen.
- Drake, John W., *The Molecular Basis of Mutation*, Holden-Day, San Francisco, 1970. Eine neue und ausführliche Zusammenfassung, wie Mutationen vor sich gehen.



## DIE TRANSKRIPTION VON RNA AN DNA-MATRIZEN

Wir sind nun so weit, daß wir an das Problem, wie DNA die Sequenz der Aminosäuren in Proteinen kontrolliert, herangehen können. Man sollte erwarten, daß dieser Auswahlvorgang im Vergleich zur DNA-Replikation ein viel komplizierterer chemischer Prozeß ist, da viele der Aminosäure-Seitenketten weder spezifische Wasserstoff-Brückenbindungen bilden noch Oberflächen aufweisen, die in ihrer Form irgendeinem Nukleotid oder einer Nukleotidgruppe deutlich komplementär sind. Trotzdem werden irgendwie die richtigen Aminosäuren mit weniger als 1 Fehler pro Tausend in eine gegebene Polypeptidkette eingebaut. Es ist daher nicht überraschend, daß die Lösung dieses Problems (allgemein als Codierungsproblem bekannt) großes theoretisches Verständnis voraussetzte, viele unerwartete Ergebnisse hervorbrachte und eine größere Vielfalt experimenteller Systeme erforderte als für das Verständnis des Mechanismus der DNA-Replikation notwendig war.

### DAS ZENTRALE DOGMA

Man sollte zuerst die Beweise dafür untersuchen, daß DNA selbst nicht die direkte Matrize ist, die die Aminosäuresequenzen ordnet. Statt dessen wird die genetische Information der DNA auf eine andere Klasse von Molekülen übertragen, die dann als Matrize für die Proteinsynthese dient. Diese Zwischenträger der Information sind Ribonukleinsäuremoleküle (RNA), große polymere Moleküle, die der DNA chemisch sehr ähnlich sind. Ihre

Beziehung zur DNA und zu Protein wird für gewöhnlich durch die Formel-oft das «zentrale Dogma» genannt - ausgedrückt, wobei die Pfeile die Übertra-



gungsrichtung der genetischen Information anzeigen. Der Pfeil, der die DNA einschließt, zeigt an, daß sie als Matrize für ihre eigene Replikation dient; der Pfeil zwischen DNA und RNA bedeutet, daß alle zellulären RNA-Moleküle auf DNA-Matrizen gemacht werden.<sup>1</sup> Dementsprechend werden alle Proteinsequenzen durch RNA-Matrizen bestimmt. Es ist überaus wichtig, daß diese beiden letztgenannten Pfeile nur in eine Richtung zeigen können, das heißt, daß RNA-Sequenzen nie auf Proteinmatrizen kopiert werden; ebenso fungiert RNA nie als Matrize für DNA.

## PROTEINSYNTHESE IN ABWESENHEIT VON DNA

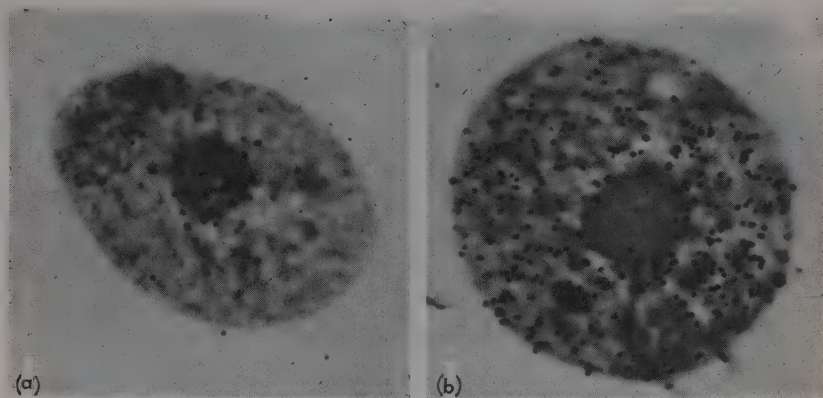
Es gibt viele Versuche, die zeigen, daß Proteine in Abwesenheit von DNA hergestellt werden können. Den eindeutigsten Beweis liefern kernhaltige Zellen, in welchen der Großteil der Proteinsynthese im Zytoplasma stattfindet; fast die gesamte DNA ist in den Chromosomen innerhalb des Kerns zu finden. Diese Beobachtung zeigt eindeutig, daß ein Zwischenträger die genetische Information an den zytoplasmatischen Ort der Synthese befördern muß. Bei Bakterienzellen, denen der Kern fehlt, ist solch ein einfacher *in vivo* Beweis nicht möglich, aber die Verwendung von zellfreien Systemen *in vitro* (siehe unten) zeigt, daß das Fehlen einer direkten Beteiligung der DNA eine allgemeine Erscheinung ist.

Als Zwischenträger fungiert eindeutig RNA. Erstens haben wir von vielen Arten kernhaltiger Zellen Beweise, daß die gesamte zelluläre RNA-Synthese auf den DNA-haltigen Kern beschränkt ist (Abbildung 11-1).<sup>2</sup> Im Zytoplasma, das keine DNA enthält, werden keine RNA-Stränge hergestellt.<sup>3</sup> RNA wird daher dort synthetisiert, wo dies geschehen sollte, wenn sie

<sup>1</sup> Obwohl diese Behauptung für normale zelluläre RNA zutrifft, stimmt sie nicht für Zellen, die mit bestimmten RNA-Viren infiziert wurden (siehe Kapitel 13).

<sup>2</sup> Diese Behauptung trifft für gewisse Virus-infizierte Zellen nicht zu (siehe Kapitel 15).

<sup>3</sup> Diese Behauptung muß jetzt eingeschränkt werden, um den kürzlich entdeckten Fakten Rechnung zu tragen, daß sowohl Mitochondrien wie Chloroplasten geringe Mengen an DNA enthalten, die als Matrizen für die RNA-Moleküle fungieren können, die bei der Synthese spezifischer Mitochondrien- und Chloroplasten-Proteine eine Rolle spielen.

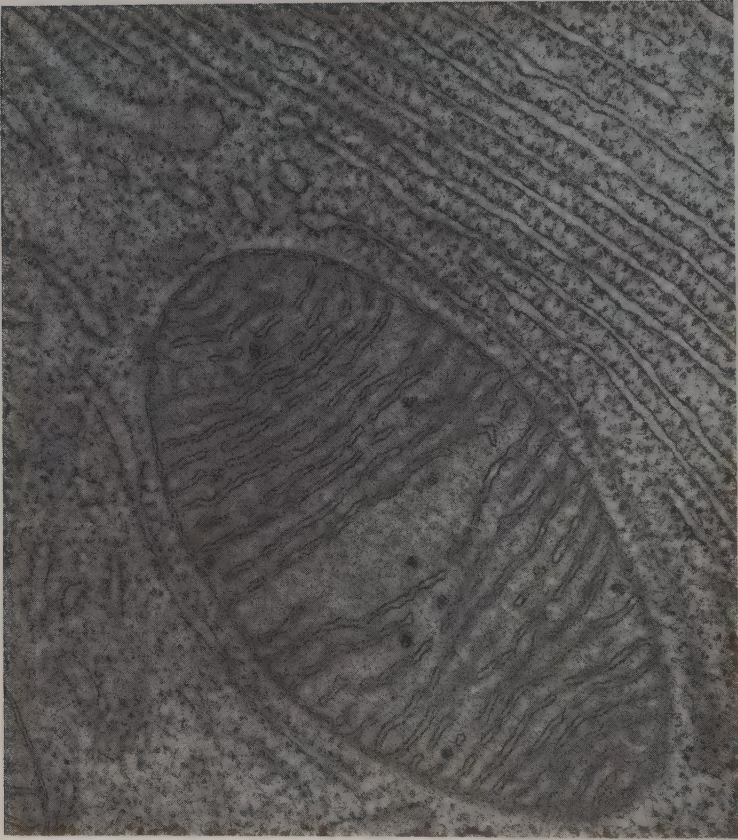


**ABBILDUNG 11-1** (a) Autoradiographie einer Zelle (*Tetrahymena*), die 15 Minuten radioaktivem Cytidin ausgesetzt wurde. Über die Aufnahme eines dünnen Zellschnittes ist die Aufnahme einer exponierten Silberemulsion gelegt. Jeder dunkle Punkt stellt den Weg eines Elektrons dar, das von einem  $^3\text{H}$  (Tritium) Atom ausgesandt wurde, welches in RNA inkorporiert wurde. Fast die gesamte neu synthetisierte RNA ist innerhalb des Kerns zu finden. (b) Autoradiographie einer ähnlichen Zelle, die 12 Minuten radioaktivem Uridin ausgesetzt wurde und die man dann 88 Minuten in Anwesenheit von inaktivem Cytidin wachsen ließ. Praktisch die gesamte Radioaktivität, die in den ersten 12 Minuten in RNA inkorporiert wurde, hat den Kern verlassen und ist in das Zytoplasma gewandert. [Aufnahmen von D.M. Prescott, University of Colorado Medical School, Progr. Nucleic Acid Res., freundlicherweise zur Verfügung gestellt; reproduziert von III, 35 (1964), mit Genehmigung.]

auf DNA gemacht wird. Nach ihrer Synthese wandern viele RNA-Moleküle in das Zytoplasma, in dem der Großteil der Proteinsynthese stattfindet.

Zweitens steht die Menge des synthetisierten Proteins in direktem Verhältnis zu dem Gehalt an zellulärer RNA. RNA-reiche Zellen synthetisieren viel Protein, während in Zellen, die wenig RNA enthalten, wenig Protein hergestellt wird. Zum Beispiel synthetisiert die RNA-reiche Pankreas (Abbildung 11-2) große Mengen von proteolytischen Enzymen, die in den Verdauungsapparat ausgeschieden werden. Dementsprechend ist in den Muskelzellen, in denen wenig Protein hergestellt wird, wenig RNA zu finden. Die Bedeutung dieser Beziehung wird durch Versuche mit Isotopen erhärtet, die dazu bestimmt sind, den Ort der Synthese innerhalb des Zytoplasmas genau zu lokalisieren. Bei diesen Versuchen werden die Zellen für sehr kurze Zeit Aminosäuren, die durch radioaktive Isotopen markiert sind, ausgesetzt. Während dieser kurzen Perioden («Pulse») wird ein Teil der radioaktiven Aminosäuren in die Proteine eingebaut. Die Zellen werden dann schnell aufgebrochen, um zu sehen in welcher Zellfraktion das neu hergestellte Protein (das dadurch identifiziert wird, daß es radioaktive Aminosäuren

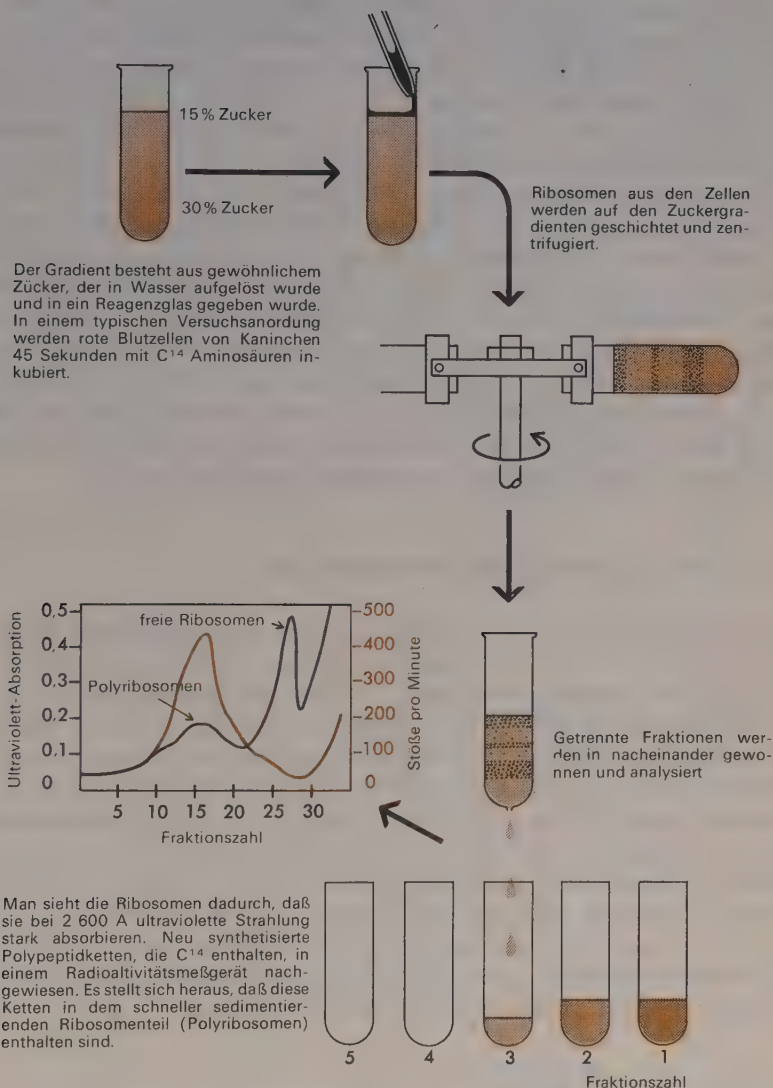




**ABBILDUNG 11-2** Elektronenmikroskopische Aufnahme (105 000 fache Vergrößerung) eines Zellausschnitts aus der Pankreas einer Fledermaus, die ein Mitochondrion und eine große Zahl von Ribosomen zeigt. Einige Ribosomen kommen frei vor; andere (besonders rechts oben) sind mit einer Membrankomponente verbunden, dem endoplasmatischen Retikulum. (Freundlicherweise von K. R. Porter zur Verfügung gestellt.)

enthält) zu finden ist. Mit allen Zellen bekommt man die gleichen Resultate: neu synthetisierte Polypeptidketten sind in Verbindung mit sphärischen RNA-haltigen Partikeln, den Ribosomen zu finden (Abbildung 11-3). Ebenso kann eine geringe Menge Protein *in vitro* in sorgfältig isolierten Zellextrakten hergestellt werden und auch hier zeigt die Verwendung radioaktiver Isotope die Verbindung eines großen Teils dieses neuen Proteins mit den RNA-reichen Ribosomen.





**ABBILDUNG 11-3** Nachweis mit Hilfe eines Rohrzuckergradienten, daß die Proteinsynthese an Ribosomen stattfindet. [Gezeichnet nach A. Rich, Sci. Am., 209, 46-47 (Dezember 1963).]

## RNA IST CHEMISCH DER DNA SEHR ÄHNLICH

Bloße Betrachtung der Struktur der RNA zeigt, wie sie auf einer DNA-Matrize genau synthetisiert werden könnte. Chemisch ist sie der DNA sehr ähnlich. Sie ist ebenfalls ein langes, unverzweigtes Molekül, das vier Arten von Nukleotiden enthält (Abbildung 11-4), die durch 3'-5' Phosphodiesterbindungen zusammengehalten werden. Zwei Unterschiede in ihrer chemischen Gruppen unterscheiden jedoch RNA von DNA. Der erste ist eine kleine Veränderung der Zuckerkomponente (Abbildung 11-6). Der Zucker der DNA ist Desoxyribose, während RNA Ribose enthält, die, bis auf die Gegenwart einer zusätzlichen OH-(Hydroxyl)-gruppe, mit Desoxyribose identisch ist. Der zweite Unterschied besteht darin, daß RNA kein Thymin enthält, sondern das eng verwandte Pyrimidin Uracil. Trotz dieser Unterschiede haben jedoch die Polyribonukleotide die Fähigkeit, komplementäre Helixstrukturen vom gleichen Typ wie DNA zu bilden. Weder die zusätzliche Hydroxylgruppe noch das Fehlen der Methylgruppe des Thymins beeinträchtigen die Fähigkeit der RNA, Doppelhelixstrukturen zu bilden, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren zusammengehalten werden.

## RNA IST FÜR GEWÖHNLICH EINZELSTRÄNGIG

Die RNA-Moleküle haben für gewöhnlich keine komplementären Basenverhältnisse (Tabelle 11-1). Die Menge von Adenin entspricht selten der von Uracil und die Mengen von Guanin und Cytosin weichen normalerweise auch voneinander ab. Daraus entnehmen wir, daß der Großteil der RNA keine regelmäßige Wasserstoffbrücken-Struktur hat, sondern, nicht wie doppelhelikale DNA, als einzelner Polyribonukleotid-Strang existiert. Wegen des Fehlens der regelmäßigen Wasserstoff-Brückenbindungen haben diese einsträngigen Moleküle keine einfache regelmäßige Struktur wie DNA. Diese strukturelle Ungewißheit gab anfänglich Anlaß zu großem Pessimismus; es herrschte nämlich allgemein die Ansicht, daß man die Matrize sehen müßte, bevor man an das Problem, wie sie die Aminosäuren während der Proteinsynthese auswählt, herangehen könnte. Zum Glück erwies sich diese Befürchtung als unbegründet, wie wir später sehen werden.

## DIE ENZYMATISCHE SYNTHESE VON RNA AN DNA-MATRIZEN

Die Tatsache, daß RNA, wie DNA, eine lange, unverzweigte Kette ist, die vier verschiedene Nukleotide verwendet, legt sofort den Gedanken nahe, daß die genetische Information der DNA-Ketten auf eine komplementäre

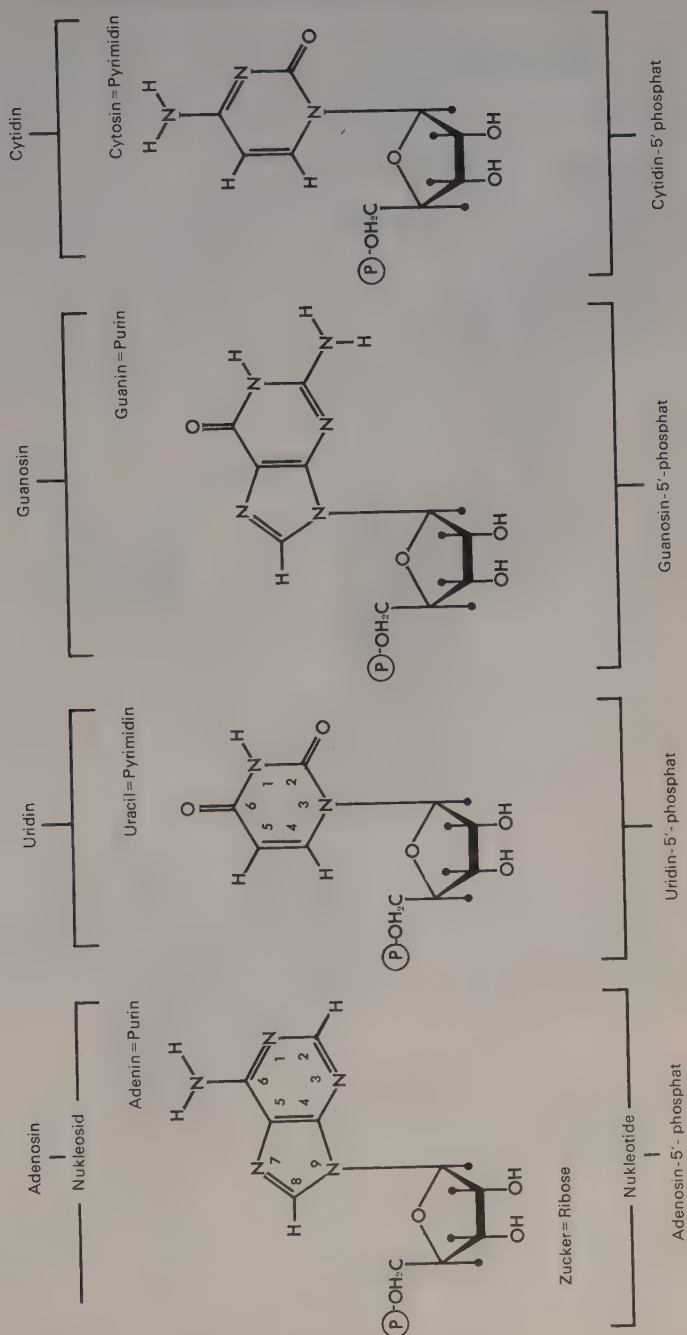


ABBILDUNG 11-4 Die Nukleotidbausteine der RNA.

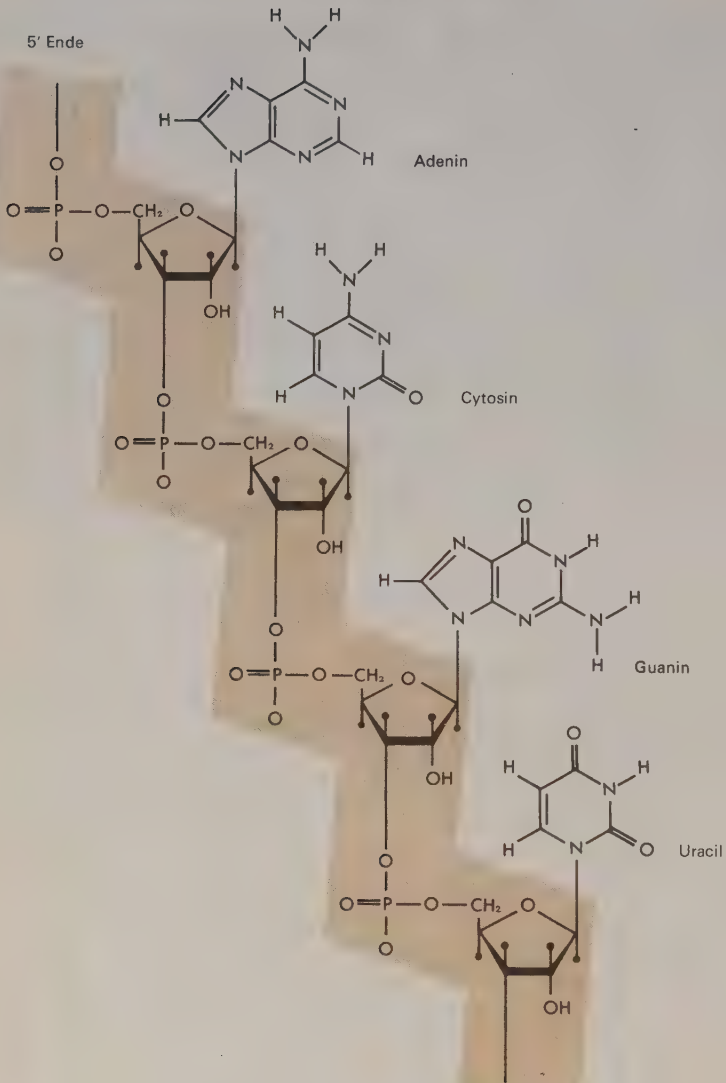


ABBILDUNG 11-5 Die chemische Formel eines Polyribonukleotids.



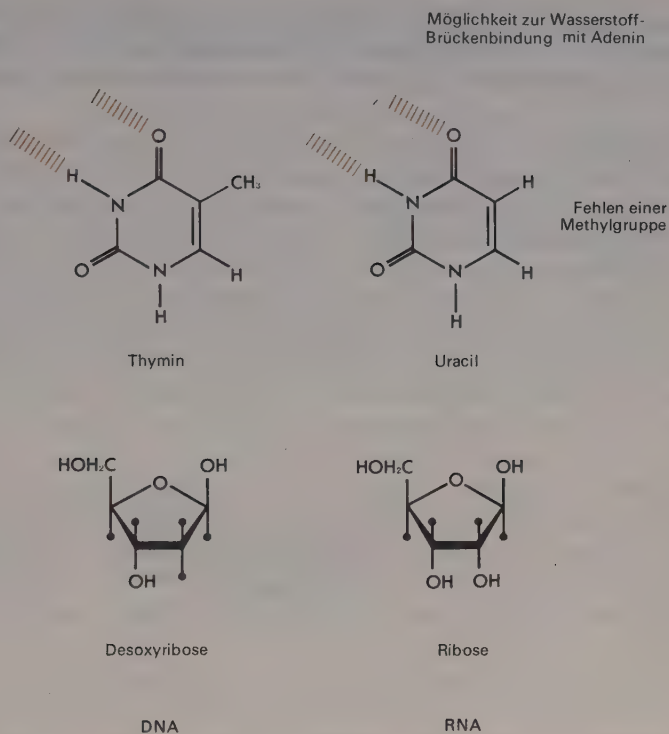


ABBILDUNG 11-6 Die Strukturen von Uracil und Ribose.

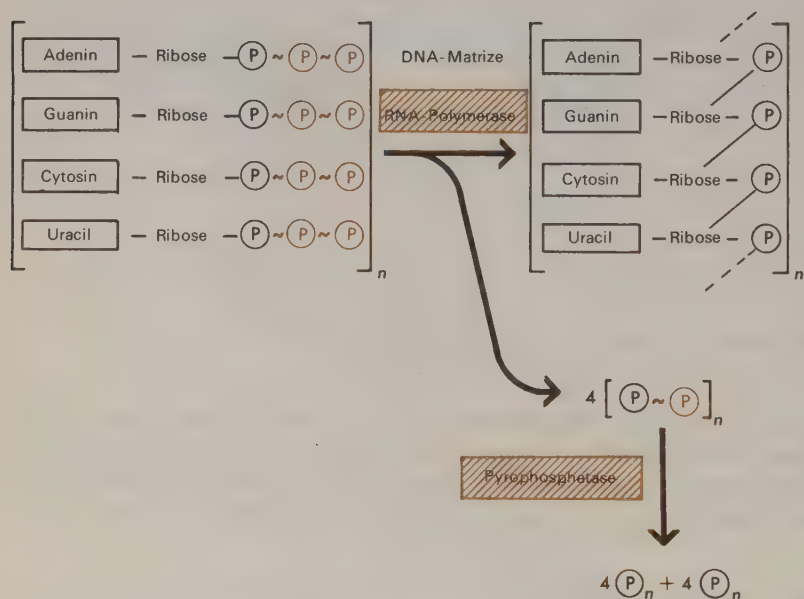
Sequenz von RNA Nukleotiden übertragen wird. Nach dieser Hypothese trennen sich die DNA-Stränge in einem oder mehreren Stadien des Zellzyklus und fungieren als Matrizen, von denen, wie bei DNA, komplementäre Ribonukleotide durch Basenpaarung [Adenin mit Thymin (Uracil) und Guanin

TABELLE 11-1 Die Basenzusammensetzung von RNA verschiedener Herkunft.

Herkunft der RNA	Verhältnis der vier hauptsächlichsten Basen			
	Adenin	Uracil	Guanin	Cytosin
<i>E. coli</i>	24	22	32	22
<i>Proteus vulgaris</i> (ein Bakterium)	26	19	31	24
<i>Euglena</i> (eine Alge)	22	21	30	27
Turnip yellow mosaic-virus	23	22	17	38
Poliomyelitis Virus	30	25	25	20
Rattenniere	19	20	30	31

mit Cytosin] angezogen werden. Zusätzlich muß irgendein Kontrollmechanismus bestimmen, ob die separierten DNA-Stränge als Matrizen für einen komplementären DNA-Strang oder für einen komplementären RNA-Strang fungieren.

Direkte Beweise für die Hypothese ergeben sich aus der Entdeckung des zugehörigen Enzyms, RNA-Polymerase, das in praktisch allen Zellen vorkommt. Dieses Enzym verbindet Ribonukleotide, indem es die Bildung der 3'-5' Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden katalysiert, die das RNA Skelett zusammenhalten (Abbildung 11-7). Es tut dies jedoch nur in Anwesenheit von DNA, was darauf schließen läßt, daß die DNA die korrekten Nukleotidvorstufen erst anordnen muß, damit die RNA-Polymerase arbeiten kann. Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung bewiesen, daß die Basenzusammensetzung der RNA variiert, wenn man DNA-



**ABBILDUNG 11-7** Enzymatische Synthese von RNA auf einer DNA-Matrize.

Moleküle verschiedener AT/GC Verhältnisse hinzugibt. Bei jeder enzymatischen Synthese entspricht das Verhältnis von AU/GC der RNA ungefähr dem von AT/GC der DNA (Tabelle 11-2).

Weitere Versuche beweisen, daß die Matrize ein einzelner DNA-Strang ist. Einer der eindeutigsten Versuche wurde unter Verwendung von DNA aus dem Virus  $\phi \times 174$  durchgeführt. Dieses Virus gehört einer sehr speziellen

**TABELLE 11-2** Vergleich der Basenzusammensetzung enzymatisch synthetisierter RNAs mit der Basenzusammensetzung ihrer doppelhelikalen DNA-Matrizen.

Herkunft der DNA-Matrize	Zusammensetzung der RNA Basen				$\frac{A+U}{G+C}$ beobachtet	$\frac{A+T}{G+C}$ in DNA
	Adenin	Uracil	Guanin	Cytosin		
T2	0,31	0,34	0,18	0,17	1,86	1,84
Kalbsthymus	0,31	0,29	0,19	0,21	1,50	1,35
<i>E. coli</i>	0,24	0,24	0,26	0,26	0,92	0,97
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> (ein Bakterium)	0,17	0,16	0,33	0,34	0,49	0,39

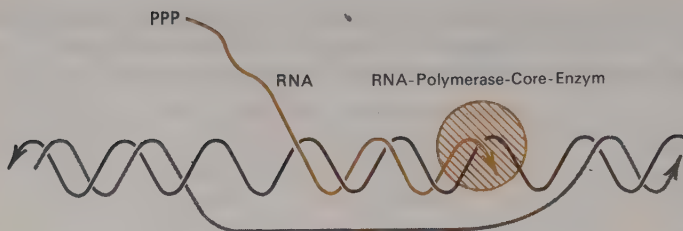
Klasse an, die einzelsträngige DNA statt der gewöhnlichen doppelhelikalen enthält. Nur einer der zwei möglichen komplementären Stränge ist vorhanden; wenn er als Matrize für die RNA-Polymerase verwendet wird, hat das enzymatische Produkt eine komplementäre Basensequenz (Tabelle 11-3). Darüber hinaus bleibt in diesem besonderen Fall das RNA Produkt mit seiner DNA-Matrize verknüpft, was die Isolierung einer hybriden DNA-RNA Doppelhelix ermöglicht. Dieses Resultat unterscheidet sich von Experi-

**TABELLE 11-3** Basenzusammensetzung enzymatisch synthetisierter RNA unter Verwendung einzelsträngiger  $\phi \times 174$  DNA als Matrize.

	$\phi \times 174$ -DNA	Beobachtete Werte des RNA Produkts	Vorausgesagte RNA Zusammensetzung
Adenin	0,25	0,32	0,33
Uracil	0,33 (Thymin)	0,25	0,25
Guanin	0,24	0,20	0,18
Cytosin	0,18	0,23	0,24
Summe	1,00	1,00	1,00

menten, die doppelhelikale DNA verwenden. Hier löst sich das RNA Produkt schnell von seiner Matrize und die zwei DNA-Stränge bilden wieder die ursprüngliche spezifische Struktur. Anscheinend ist eine Doppelhelix aus zwei komplementären DNA-Strängen energetisch stabiler als die Hybride aus DNA und RNA, sodaß der freie DNA Einzelstrang das RNA Produkt verdrängt, kurz nachdem die RNA-Polymerase über den entsprechenden Bereich der Matrize gewandert ist (Abbildung 11-8).

Wir sehen daraus, daß der grundlegende Mechanismus für die Synthese



**ABBILDUNG 11-8** *Transkription eines RNA-Moleküls an einem einzelnen Strang seiner DNA-Matrize. Die Anheftung des Enzyms RNA-Polymerase an das DNA-Molekül öffnet einen kurzen Abschnitt der Doppelhelix und erlaubt dabei freien Basen an einem Ende des DNA-Stranges, mit den Ribonukleosid- $\text{-P} \sim \text{P} \sim \text{P}$ -Vorstufen Basenpaarungen einzugehen. Sowie sich die RNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize bewegt, schält sich der wachsende RNA-Strang ab und ermöglicht die neuerliche Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen zwei komplementären DNA-Strängen. Somit wird fast unmittelbar nachdem die Synthese eines RNA-Stranges begonnen hat, sein vorderes Ende für die Bindung eines Ribosoms zugänglich (siehe Kapitel 12).*

der RNA dem der DNA sehr ähnlich ist. In beiden Fällen sind die unmittelbaren Vorstufen Nukleosidtriphosphate, die die Energie in einer ihrer Pyrophosphatbindungen verwenden, um die Reaktion zur Synthese zu lenken. Auch wirkt in beiden Fällen ein einziges Enzym auf alle vier möglichen Nukleotide, deren richtige Auswahl durch die notwendige Basenpaarung mit einer Polynukleotid-Matrize diktiert wird. Die Transkription der RNA an DNA könnte daher ebenso präzise ablaufen wie die Selbstreplikation der DNA. In jedem Fall werden die sehr seltenen Fehler, die bei der RNA Transkription auftreten, nicht auf viele darauffolgende Zellegenerationen weitergegeben, da die zelluläre RNA kein selbst-replizierendes Molekül ist.

#### IN JEDEM GEN FUNGIERT NUR EIN DNA-STRANG ALS MATRIZE FÜR RNA

Wenn jeder der zwei DNA-Stränge eines bestimmten Gens als RNA-Matrize fungieren könnte, würde jedes Gen zu zwei RNA Produkten mit komplementären Sequenzen führen, die zwei verschiedene Proteine codieren sollten. Da uns unsere genetischen Daten zeigen, daß jedes Gen nur ein Protein bestimmt, müssen wir annehmen, daß entweder nur einer der zwei möglichen RNA-Stränge hergestellt wird oder daß, wenn beide synthetisiert werden, aus irgendeinem Grund nur einer funktionsfähig ist. Es scheint, daß die erste Möglichkeit richtig ist - *in vivo* findet man nur eines der zwei möglichen RNA Produkte des Gens. Dies ist ganz eindeutig zu sehen, wenn man

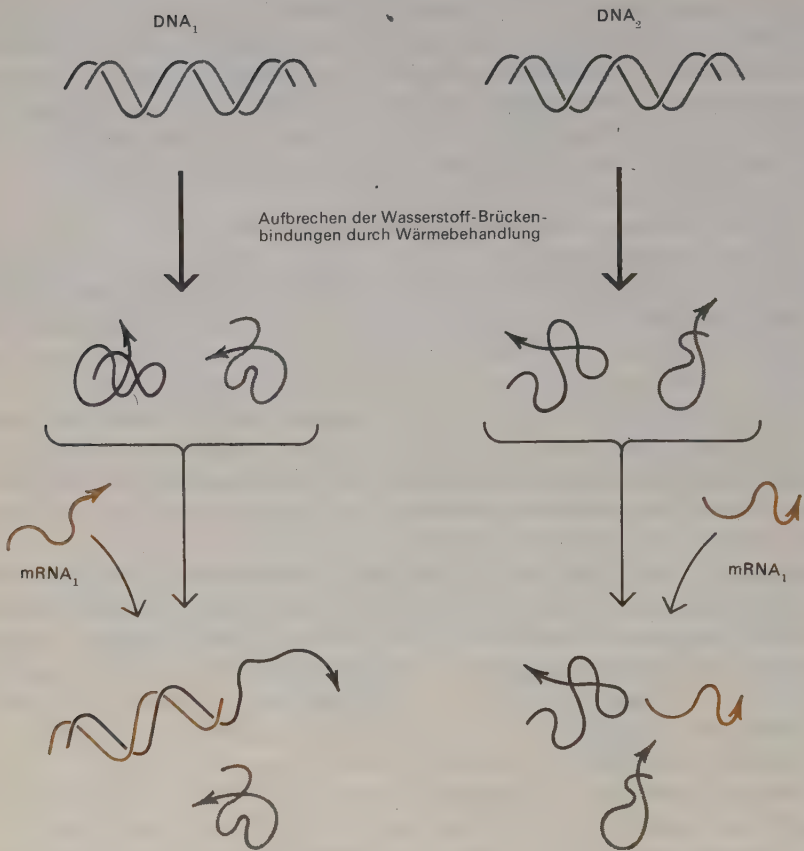


die RNA untersucht, die *in vivo* unter der Steuerung des Virus SP8 synthetisiert wurde, das sich in dem Bakterium *Bacillus subtilis* vermehrt. Die zwei komplementären DNA-Stränge des SP8 haben, anders als die der meisten anderen Viren, vollkommen verschiedene Basenzusammensetzungen und können verhältnismäßig leicht voneinander getrennt werden. Man kann daher die Frage stellen, ob die Basensequenzen der RNA Produkte einem oder beiden DNA-Strängen komplementär sind.

Zur Beantwortung dieser Frage nützte man die Möglichkeit aus, künstliche DNA-RNA hybride Moleküle zu bilden; dazu vermischte man RNA-Moleküle mit einzelsträngigen DNA-Molekülen, die sich bei dem Erhitzen doppelhelikaler DNA bilden. Erhitzen von DNA-Molekülen auf Temperaturen etwas unter 100°C, bricht die Wasserstoffbrücken auf, die die komplementären Stränge zusammenhalten; sie trennen sich hierauf schnell voneinander (DNA Denaturierung). Wenn man die Temperatur schrittweise senkt, gehen die Komplementärstränge wieder die richtigen Wasserstoff-Brückenbindungen ein und die Doppelhelix bildet sich zurück (Renaturierung der DNA). Wenn jedoch diese langsame Abkühlung in Gegenwart von einzelsträngiger RNA vorgenommen wird, die an homologer DNA synthetisiert wurde, dann bilden sich DNA-RNA-Hybriden ebenso wie renaturierte DNA Doppelhelices (Abbildung 11-9). Diese DNA-RNA-Hybriden sind sehr spezifisch und bilden sich nur, wenn einige der Nukleotidsequenzen der DNA komplementär zu den RNA Nukleotidsequenzen sind. Diese Methode wirft die Frage auf, ob die RNA Produkte der *in vivo* Synthese mit nur einem oder beiden der komplementären SP8-DNA-Stränge Hybriden bilden. Das Ergebnis ist eindeutig: Nur ein DNA-Strang wird kopiert.

Da nur einer der DNA-Stränge eines Gens kopiert wird, kann man verstehen, warum die Basenverhältnisse von RNA nicht komplementär zu sein brauchen, obwohl RNA an einer DNA-Matrize hergestellt wird. Es gibt keinen Grund, warum in einem bestimmten DNA-Strang A so groß wie T oder G so groß wie C sein sollte. Diese Verhältnisse müssen nur dann eins zu eins sein, wenn die entsprechenden Basen auf den beiden komplementären Ketten zusammengezählt werden. So muß man im allgemeinen annehmen, daß man nur ausnahmsweise in einem DNA-Molekül Einzelstränge mit komplementären Basenverhältnissen finden wird. Dementsprechend wird man nur selten einsträngige RNA-Moleküle finden, in denen A so groß ist wie U und G so groß wie C.

Unterschiedliche Kopierung der zwei Stränge eines DNA-Moleküls kann auch *in vitro* beobachtet werden. Dieses Ergebnis hängt von der Verwendung von DNA-Matrizen ab, die nicht stark beschädigt wurden. Wenn zum Beispiel T7-DNA denaturiert wurde, um Einzelstränge zu erzeugen oder wenn sie aufgebrochen wurde, um einzelsträngige Bereiche zu ergeben, dann werden beide Stränge kopiert. Wenn jedoch intakte Moleküle von T7-DNA



**ABBILDUNG 11-9** Verwendung von DNA-RNA-Hybriden, um die Komplementarität der Nukleotidsequenzen zwischen einem RNA-Molekül und einem der beiden Stränge seiner DNA-Matrize zu zeigen. Die linke Seite des Schemas zeigt die Bildung eines hybriden Moleküls zwischen einem RNA-Molekül und einem der beiden Stränge der Matrize. Die Spezifität dieser Methode wird rechts gezeigt. Hier wird das gleiche RNA-Molekül mit nicht verwandter DNA gemischt. Es bilden sich keine hybriden Moleküle.

( $MG = 2,6 \times 10^7$ ) *in vitro* als Matrizen verwendet werden, dann ist der DNA-Strang, der kopiert wird, derselbe, der *in vivo* während der Virusvermehrung kopiert wird (Abbildung 11-10).

Die Transkriptionsmuster an anderen Chromosomen sind oft nicht so eindeutig wie bei T7 oder SP8. Beide Stränge der T4 und des  $\lambda$  Chromosoms werden transkribiert, wobei ein Strang als Matrize für einige Gene dient (für gewöhnlich zusammenhängende Gruppen), während die übrigen Gene

am anderen Strang transkribiert werden (Abbildung 15-16). Dasselbe trifft für das *E. coli* Chromosom zu, das sowohl im Uhrzeigersinn als auch gegen den Uhrzeigersinn transkribiert werden kann. Es werden viel mehr Gene (z.B. Lactose-, Tryptophan- und Galactosegruppen) gegen den Uhrzeigersinn gelesen als im Uhrzeigersinn. Es bleibt noch festzustellen, ob dies irgendeine tatsächliche Bedeutung hat. Da sich das replizierende bakterielle Chromosom ständig in einer festgelegten Richtung dreht, könnte auf den ersten Blick das Aufwinden der wachsenden RNA-Ketten mit der Rotation ihrer Matrizen in Verbindung stehen. Aber dies scheint nicht der Fall zu sein. Ein Beispiel ist bekannt, in dem die Orientierung der Lactose Gene innerhalb des *E. coli* Chromosoms umgekehrt ist, sodaß sie im Uhrzeigersinn statt gegen den Uhrzeigersinn gelesen werden müssen. Soweit wir feststellen können, ist ihre Transkriptionsrate die gleiche und daher unabhängig von der Ausrichtung der Gene.

### RNA-KETTEN SIND NICHT ZIRKULÄR

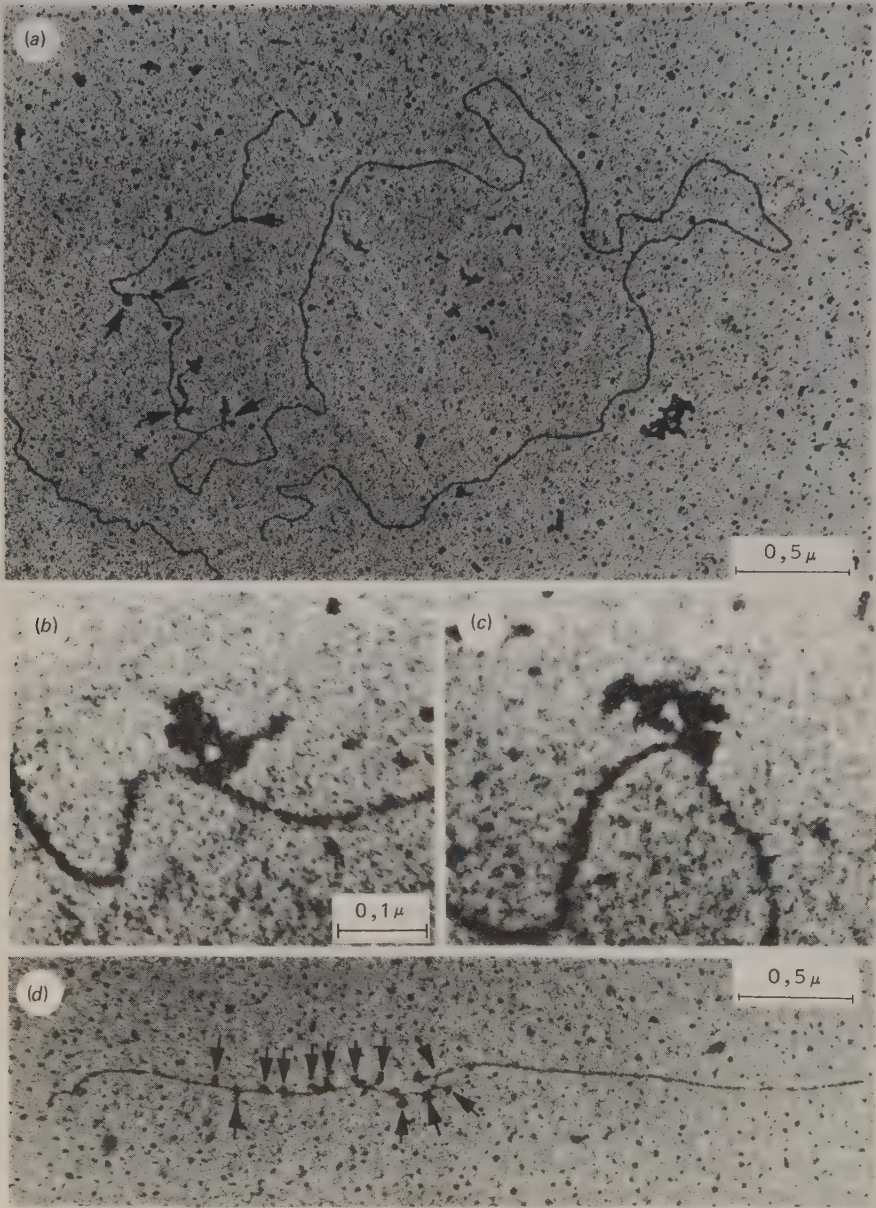
Alle bisher überprüften RNA-Ketten sind linear. Trotz sehr intensiver Forschungen ist kein Beispiel zirkulärer RNA, nicht einmal unter den RNA-haltigen Viren, gefunden worden.<sup>4</sup> Die Größe dieser linearen Moleküle kann viel stärker variieren als die von DNA-Ketten. Einige sind aus nur 75 Nukleotiden aufgebaut, während andere mehr als 10.000 enthalten können. Unabhängig von ihrer Länge haben sie für gewöhnlich keine vollkommen willkürliche Gestalt. Der Großteil der Basen ist durch Wasserstoffbrücken aneinander gebunden, nach Art der DNA Basenpaarung (A mit U, G mit C). Dies wird durch Haarnadelschlingen erreicht (Abbildung 11-11), die die Basen derselben Ketten in eine DNA-artige doppelhelikale Anordnung bringen. Solche Konfigurationen sind möglich, wenn die Zahl der Adeninreste auf einem gegebenen Kettenabschnitt ungefähr der Zahl der Uracilreste gleichkommt oder wenn die Guaninzahl ungefähr der Cytosinzahl entspricht.

### DIE SYNTHESE DER RNA-KETTEN LÄUFT IN EINER FESTGELEGTEN RICHTUNG AB

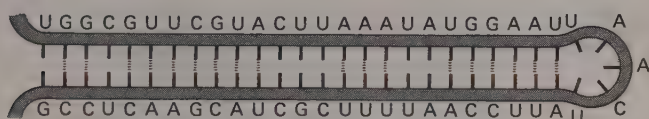
Sowie DNA-Ketten, hat jede RNA-Kette eine Richtung, die durch die Ausrichtung des Zucker-Phosphat-Skeletts bestimmt wird. Das Kettenende, das durch das 5'-Kohlenstoffatom abgeschlossen wird, wird das 5'-Ende genannt,

<sup>4</sup> Nachdem dieser Abschnitt geschrieben wurde, berichteten Agol, Drygin, Romanova und Bogdanov (FEBS Letters, 8: 13 (1970) daß sie eine zirkuläre Replikationsform der RNA des Encephalomyocarditis (EMC) Virus der Maus gefunden hätten.







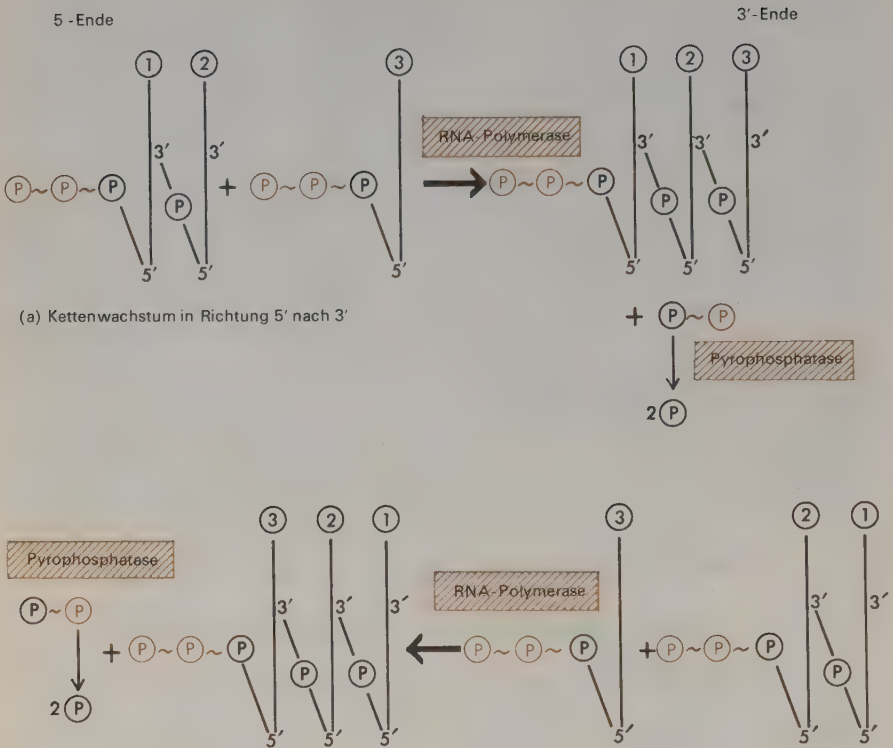


Tatsächliches Beispiel einer RNA-Schlinge in der RNA des Virus R17

**ABBILDUNG 11-11** Schematische Faltung einer RNA-Kette, die mehrere doppelhelikale Bereiche zeigt, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden.

während das Ende mit dem 3'-Kohlenstoffatom das 3'-Ende genannt wird (Abbildung 11-5). Bis vor kurzem gab es keine Beweise ob RNA-Ketten in der 3' nach 5' Richtung wachsen oder umgekehrt. Wenn sie von 5' nach 3' wachsen, dann erwarten wir, daß das erste Nukleotid eine  $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$  Gruppe enthält (Abbildung 11-12). Wenn die Ketten von 3' nach 5' wachsen, dann wird das Nukleotid am wachsenden Ende die  $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$ -Gruppe

**ABBILDUNG 11-10** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer in vitro Transkription der T7-DNA. In (a) sind mehrere wachsende RNA-Ketten zu sehen, die mit der DNA-Matrize verbunden sind. Alle RNA-Ketten werden vom selben T7-Strang transkribiert und beginnen ihr Wachstum an einem einzigen Punkt nahe dem Ende, das rechts zu sehen ist. Die gesamte Synthesezeit beträgt 5 Minuten bei 37°C. In (b) und (c) werden zwei haftende RNA-Ketten in stärkerer Vergrößerung gezeigt. In (d) wurde die Synthese bei 37°C nach 2 1/2 Minuten beendet. - Man kann 12 wachsende Ketten, alle an einem Ende, feststellen. (Freundlicherweise von Dr. R. Davis, California Institute of Technology, zur Verfügung gestellt.)



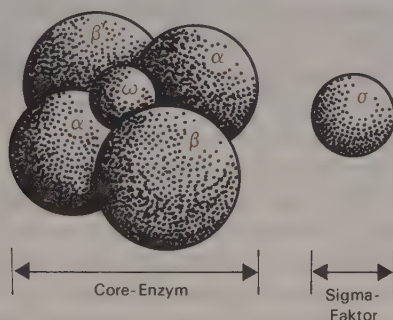
**ABBILDUNG 11-12** *Alternative Richtungen für die Synthese einer RNA-Kette. Neuere Versuche deuten darauf hin, daß die Ketten immer in Richtung von 5' nach 3' wachsen.*

enthalten. Es gibt jetzt sichere Beweise, daß die Wachstumsrichtung von 5' nach 3' ist. Neu eingebaute Nukleotide sind an den 3'-Enden zu finden, während die  $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$ -Gruppen in Verbindung mit jenen Nukleotiden zu finden sind, die das Kettenwachstum begannen.

Untersuchungen mit dem Stoffwechsellinhibitor 3'-Desoxyadenosin bestätigen, daß Wachstum in der 5' nach 3' Richtung vor sich geht. Wenn man es Zellen zugibt, wird es zuerst zu 3'-Desoxyadenosin- $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$  phosphoryliert und dann mit dem wachsenden 3'-Ende verbunden. Da es keine 3'-OH Gruppe enthält, kann sich kein weiteres Nukleosid- $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$  binden und die RNA-Synthese hört auf.

## AUFBAU DER RNA-POLYMERASE AUS UNTEREINHEITEN

Im Gegensatz zur DNA-Polymerase, die nur aus einer einzigen Polypeptidkette besteht, hat die RNA-Polymerase eine sehr komplizierte Struktur, die aus Untereinheiten aufgebaut ist. Die aktive Form, die bei ungefähr 15 S sedimentiert, enthält 5 verschiedene Polypeptidketten,  $\beta'$ ,  $\beta$ ,  $\sigma$ ,  $\alpha$  und  $\omega$ , mit den jeweiligen Molekulargewichten von 160.000, 150.000, 90.000, 40.000 und 10.000. Zwischen den verschiedenen Ketten bestehen keine kovalenten Bindungen; die Aggregation kommt durch sekundäre Wechselwirkungen zustande. Mit Ausnahme der  $\alpha$ -Kette, die zweimal vorkommt, ist jede spezifische Kette nur einmal im aktiven Molekül vorhanden; das vollständige Enzym ( $\beta'\beta\alpha_2\omega\sigma$ ) hat daher ein Molekulargewicht von etwas über einer halben Million (Abbildung 11-13). Die Verbindung von  $\sigma$  mit den anderen Ketten ist nicht sehr fest, sodaß es verhältnismäßig einfach ist, ein  $\beta'\beta\alpha_2\omega$  Aggregat zu isolieren. Diese spezifische Gruppierung wird das Core-Enzym genannt, da sie die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen Nukleotiden gleich gut in Anwesenheit wie in Abwesenheit von  $\sigma$  katalysiert.



**ABBILDUNG 11-13** Schematische Darstellung der RNA-Polymerase, die den Aufbau aus Untereinheiten zeigt.

## ERKENNUNG VON STARTSIGNALEN DURCH $\sigma$

Somit hat  $\sigma$  alleine keine katalytische Funktion; seine Aufgabe ist die Erkennung von Startsignalen auf dem DNA-Molekül. *In vitro* Versuche zeigen, daß das Core-Enzym in Abwesenheit von  $\sigma$  zwar manchmal die RNA-Synthese beginnt, aber dies ist das Ergebnis von Startfehlern. RNA-Ketten, die von dem Core-Enzym allein hergestellt werden, beginnen willkürlich an beiden Strängen eines Gens. Wenn  $\sigma$  jedoch anwesend ist, wird der richtige Strang ausgewählt, was anzeigt, daß  $\sigma$  irgendwie eine spezifische Nukleotidsequenz erkennt, die den Beginn von einer RNA-Kette signalisiert. Wir wissen derzeit noch nicht, ob in einer bestimmten Zelle alle  $\sigma$  Moleküle

identisch sind oder ob es eine Anzahl verschiedener  $\sigma$  gibt, von denen sich jedes mit dem Core-Enzym verbinden und ein anderes Startsignal erkennen kann. In Kapitel 15 werden wir endgültig nachweisen, daß in Zellen, die durch bestimmte Viren infiziert wurden, neue Virus-spezifische  $\sigma$  auftreten. Nachdem  $\sigma$  ein richtiges Startsignal erkannt hat und das Kettenwachstum begonnen hat, trennt sich  $\sigma$  vom Core-Enzym-DNA-Komplex ab,  $\sigma$  kann sich dann an ein anderes Core-Molekül binden. Die zelluläre RNA-Synthese verläuft somit nach dem in Abbildung 11-14 dargestellten Zyklus.

### KETTEN BEGINNEN ENTWEDER MIT pppA ODER pppG

Es scheint, daß alle normalen RNA-Ketten entweder mit Adenin oder Guanin beginnen. In *E. coli* beginnt ein Großteil der Ketten mit einem G, während mehr Ketten mit A beginnen, wenn T4-DNA die Matrize ist. Diese Ergebnisse zeigen, daß die erste DNA-Base, die kopiert wird, ein Pyrimidin sein muß, entweder T oder C. Tatsächlich weisen die Befunde mit mehreren Viruschromosomen darauf hin, daß nahe an den Startsignalen eine Anzahl von aufeinanderfolgenden Pyrimidinbasen vorhanden ist. In  $\lambda$ -DNA ist die Zahl der poly-C-Gruppen der Anzahl von Startpunkten ziemlich gleich. Die meisten dieser Pyrimidinreste dürfen jedoch nicht transkribiert werden, da die zweite RNA-Base am 5'-Ende der RNA-Kette oft ein Pyrimidin ist.

Einige offensichtliche Ausnahmen zu der Regel, daß Ketten immer mit A oder G anfangen müssen, haben einfache Erklärungen. Nach der Synthese werden viele RNA-Ketten durch Endonukleasen in kleinere Fragmente gespalten, von denen viele mit einem Pyrimidin beginnen. Obwohl zum Beispiel einige tRNA-Ketten mit U beginnen (siehe Kapitel 13), enthalten sie niemals terminale Triphosphatgruppen, was deutlich darauf hinweist, daß sie durch *in vivo* Spaltung aus längeren Ketten entstanden sind. Da praktisch alle Zellen eine Vielfalt von Nukleasen enthalten, ist es wahrscheinlich, daß eindeutige Daten über Initiierungs-Nukleotidsequenzen aus *in vitro* Versuchen kommen werden, wo es möglich ist, Nukleaseeffekte auszuschließen, indem man höchst gereinigte Enzyme verwendet.

### FREISETZUNGSFAKTOREN LIEFERN KETTEN VON BEGRENZTER LÄNGE

Es gibt auch Stoppsignale, deren Funktion darin besteht, die RNA-Synthese an spezifischen Punkten auf der DNA-Matrize zu beenden. Die Ablesung dieser Stoppsignale erfolgt nicht durch RNA-Polymerase, sondern durch ein spezifisches Protein - den  $\rho$ -Faktor. Es wurde noch nicht festgestellt,



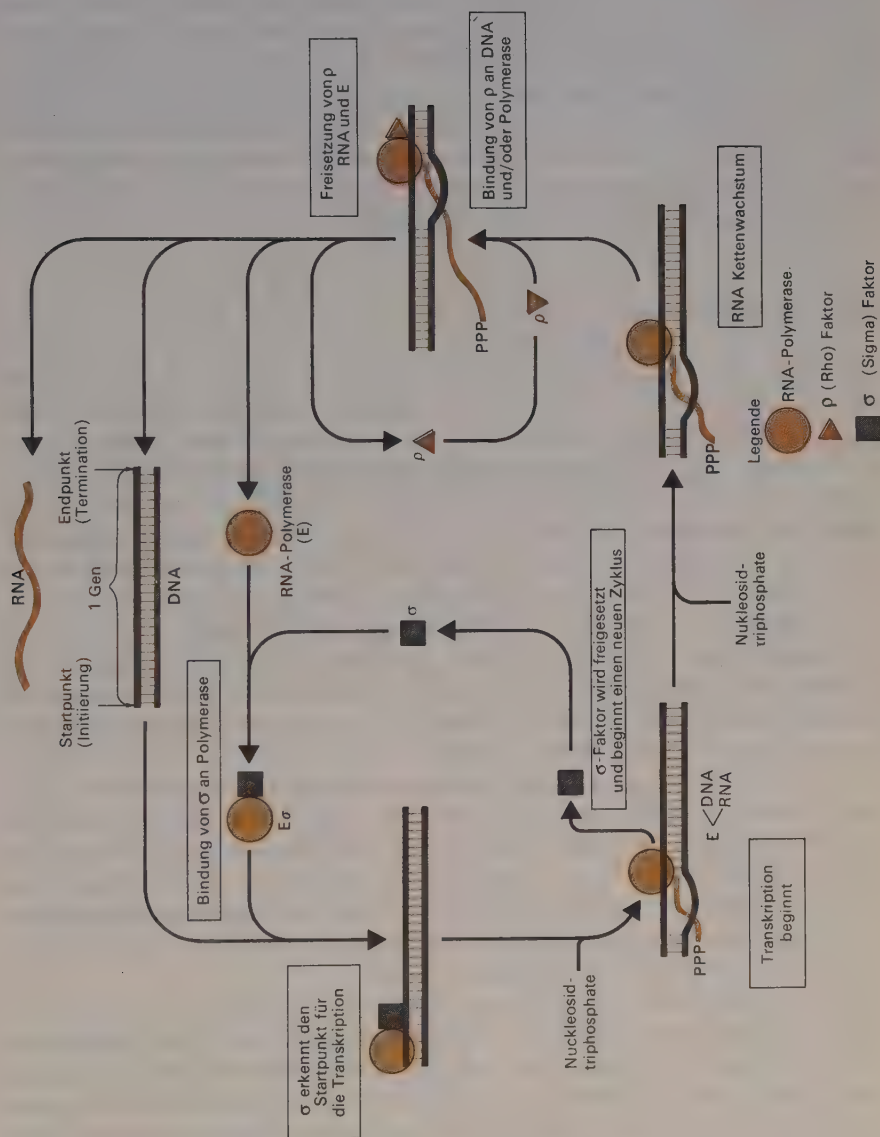


ABBILDUNG 11-14 Schema der RNA-Synthese.

wie dieses Protein, das ein Molekulargewicht von ungefähr 60.000 hat, funktioniert. Da es stabil und verhältnismäßig leicht zu isolieren ist, sollten wir bald wissen, ob es sich direkt an die DNA-Stoppsignale bindet oder ob es sich zuerst an die RNA-Polymerase heftet. Wenn der  $\rho$ -Faktor fehlt, wird die Kettenverlängerung am Stoppsignal nicht blockiert, sondern geht über das Signal hinaus, was zur Folge hat, daß die benachbarte genetische Region transkribiert wird. Es gibt derzeit keine Angaben; ob es nur eine Art von  $\rho$ -Faktor gibt. Wir wissen auch nicht, ob alle Stoppsignale identisch sind oder ob einige immer zu Kettenabbruch führen und andere gelegentlich ein Weiterlesen benachbarter Gene erlauben.

## ZUSAMMENFASSUNG

*DNA-Moleküle dienen nicht direkt als Matrizen für die Proteinsynthese. Die genetische Information der DNA wird zuerst auf RNA-Moleküle übertragen. RNA-Moleküle wiederum fungieren als die primären Matrizen, die die Aminosäuresequenzen in Proteinen bestimmen ( $DNA \rightarrow RNA \rightarrow Protein$ ). Die kovalente Struktur von RNA ist chemisch der von DNA sehr ähnlich, ihre genetische Information wird ebenfalls in den Sequenzen ihrer vier Basen gespeichert. Im Gegensatz zu DNA ist jedoch der größte Teil der RNA-Moleküle einzelsträngig und linear. Die Synthese von RNA an DNA-Matrizen zeigt viele Ähnlichkeiten mit der DNA-Replikation. Es ist äußerst wichtig, daß der Auswahlprozeß über Bildung von komplementären Basenpaaren erfolgt. Das Enzym RNA-Polymerase bindet die monomeren Vorstufen, die Ribonukleosidtriphosphate (ATP, GTP, CTP und UTP). In einem bestimmten Gen wird nur einer der zwei DNA-Stränge kopiert.*

*RNA-Polymerase ist aus fünf Arten von Polypeptidketten aufgebaut. Eine dieser Ketten,  $\sigma$ , trennt sich leicht von den anderen vier ab, die zusammen das Core-Enzym ausmachen. Das Core-Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen, während  $\sigma$  für die Erkennung des Startsignals auf den DNA-Molekülen verantwortlich ist. Nachdem die Initiierung stattgefunden hat, trennt sich  $\sigma$  von dem DNA-RNA-Core-Enzym-Komplex ab und wird frei, um sich an ein anderes Core-Enzym zu binden.*

*Die Synthese aller Ketten beginnt entweder mit Adenin oder Guanin, je nach dem spezifischen Startsignal auf der DNA-Matrize. Die Verlängerung geht in Richtung von 5' nach 3' vor sich; die 5'-terminalen Nukleotide enthalten daher immer eine  $P \sim P \sim P$ -Gruppe. Die Synthese hört auf, sobald Stoppsignale erreicht werden, die, wie die Startsignale, spezifische Nukleotidsequenzen sind. Der Kettenabbruch hängt auch noch von der Anwesenheit eines spezifischen Proteins, des  $\rho$ -Faktors, ab. Die molekulare Funktionsweise von  $\rho$  muß erst erforscht werden*

## LITERATUR

- Prescott, D. M., «Cellular Sites of RNA Synthesis», in J. N. Davidson und W. E. Cohn (Eds.), *Progr. Nucleic Acid Res.*, **III**, 35-37 (1964). Eine sehr klare Diskussion der zellbiologischen Methoden, die zeigten, daß der Kern der Ort eines Großteils der RNA-Synthese ist.
- Spiegelman, S. S. «Hybrid Nucleic Acids», *Sci. Am.* Mai, 1964, S. 48-56. Hier werden viele der experimentellen Methoden verständlich erklärt, die auf so elegante Art angewandt wurden, um die Homologie der Nukleotidsequenzen zwischen DNA und RNA zu zeigen.
- Marmur, J., D. Greenspan, F. Palacek, F. M. Kahan, J. Levine und M. Mandel, «Specificity of the Complementary RNA Formed by *B. subtilis* Infected with Bacteriophage SP8», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 191-199 (1963). Beschreibung eines Versuches, der zeigt, daß *in vivo* nur einer der beiden DNA-Stränge aus SP8 als Matrize für die RNA-Synthese fungiert.
- Taylor, K., Z. Hradecna und W. Szybalski, «Asymmetric Distribution of the Transcribing Regions on the Complementary Strands of Coliphage  $\lambda$  DNA», *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **57**, 1618 (1967). Anwendung der DNA-RNA Hybridisierung, um das Transkriptionsmuster des Phagen festzustellen.
- Geiduschek, E. P., und R. Haselkorn, «Messenger RNA», *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 647 (1969). Eine sehr klare Zusammenfassung, wie RNA-Ketten synthetisiert werden; mit großer Betonung der Funktionsweise der RNA-Polymerase.
- Burgess, R., A. A. Travers, J. J. Dunn und E. K. F. Bautz, «Factor Stimulating Transcription by RNA Polymerase» *Nature*, **222**, 537 (1969). Die klassische Arbeit über die Trennung der RNA-Polymerase in Core und  $\sigma$ -Komponenten.
- RNA Polymerase and Transcription*, L. Silvestri (Ed.), North Holland Publ. Co., Amsterdam (1970). Eine Sammlung von Vorträgen während einer Tagung, die kurz nach der Entdeckung von  $\sigma$  in Florenz abgehalten wurde.
- «Transcription of Genetic Material», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, (1970). Sammlung von mehr als 90 Artikeln, die das Stadium des Transkriptionsproblems im Juni 1970 zeigten. Die derzeit umfassendste Sammlung von Daten über die Synthese von RNA.

# 12

## DIE ROLLE DER RNA BEI DER PROTEINSYNTHESE

Wir werden uns jetzt ansehen, wie einsträngige RNA-Moleküle bei der Proteinsynthese wirken. Als die allgemeine Gültigkeit des zentralen Dogmas ( $\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{Protein}$ ) Mitte der 50er Jahre offensichtlich wurde, herrschte allgemein der Glaube, daß die gesamte RNA Matrizen-RNA sei. Es bestand auch die Hoffnung, daß, sobald die allgemeine Struktur der RNA aufgeklärt wäre, bloße Betrachtung uns sagen würde, wie die RNA die Aminosäuresequenzen bestimmt. Heute wissen wir jedoch, daß diese Ansichten sehr naiv waren und daß die Proteinsynthese eine viel kompliziertere Angelegenheit ist als die Synthese der Nukleinsäuren. Außerdem sind nicht alle RNA-Moleküle Matrizen. Zusätzlich zu einer Klasse mit Matrizen-Charakter existieren zwei weitere Klassen von RNA, von denen jede eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese spielt.

### AMINOSÄUREN HABEN KEINE SPEZIFISCHE AFFINITÄT FÜR RNA

Der Hauptgrund für diese Komplexität wurde schon früher erwähnt. Es besteht keine spezifische Affinität zwischen den Seitengruppen vieler Aminosäuren und den Purin- und Pyrimidinbasen der RNA. Zum Beispiel gehen die Kohlenwasserstoff-Seitengruppen der Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin keine Wasserstoff-Brückenbindungen ein und würden von den Amino- und Ketogruppen der verschiedenen Nu-



kleotidbasen aktiv abgestoßen werden. Ebenso ist es schwierig, sich die Existenz spezifischer RNA Oberflächen mit besonderen Affinitäten für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan vorzustellen. Es ist daher für diese Aminosäuren in unmodifizierter Form unmöglich, sich vor der Bildung der Peptidbindungen in einer spezifischen, genauen Reihenfolge entlang einer RNA-Matrize passiv auszurichten.

### **AMINOSÄUREN BINDEN SICH MIT HILFE VON ADAPTOREN AN RNA-MATRIZEN**

Bevor sich die Aminosäuren entlang der RNA-Matrize ausrichten, werden sie chemisch modifiziert, damit sie eine spezifische Oberfläche erhalten, die fähig ist, sich mit einer spezifischen Anzahl der Wasserstoffbrückenbindenden Gruppen entlang der Matrize zu verbinden. Diese chemische Änderung besteht aus der Hinzufügung eines spezifischen Adaptormoleküls an jede Aminosäure durch eine einzelne kovalente Bindung. Es ist dieser Adaptorbestandteil, der sich mit der Matrize verbindet; die Seitengruppe der Aminosäure braucht niemals mit der Matrize zu reagieren. Es ist viel ökonomischer, an eine Aminosäure einen spezifischen Adaptorest anzuknüpfen, als die Seitengruppe selbst chemisch zu modifizieren. Beim letztgenannten Prozeß könnten viele Enzyme für eine einzige Aminosäure benötigt werden. Es ist denkbar, daß eine gleich große Anzahl von Enzymen erforderlich wäre, um eine adaptierte Seitengruppe in ihre ursprüngliche Form zurückzuführen, nachdem sie ein Teil einer Polypeptidkette geworden ist. Andererseits wird nur ein einziges Enzym benötigt, um eine Aminosäure entweder mit ihrem spezifischen Adaptor zu verbinden oder sie abzuspalten.

### **SPEZIFISCHE ENZYME ERKENNEN SPEZIFISCHE AMINOSÄUREN**

Zwischen der Form der Aminosäure-Seitengruppen und der Oberfläche des Adaptors braucht keine offensichtliche Beziehung zu bestehen. Statt dessen wird die entscheidende Auswahl einer Aminosäure durch ein spezifisches Enzym getroffen. Das Enzym, das die Verbindung der Aminosäure mit ihrem Adaptor katalysiert, muß fähig sein, sich spezifisch sowohl mit der Aminosäure-Seitengruppe als auch mit dem Adaptor zu verbinden. Für diese Aufgabe eignen sich Proteine besonders gut, denn ihre aktiven Bereiche können reich an hydrophilen oder hydrophoben Gruppen sein. Es ist nicht schwierig, eine passend angeordnete Polypeptidkette so zu falten, daß eine Mulde erzeugt wird, die für die Seitengruppe einer spezifischen Aminosäure spezifisch ist. Zum Beispiel kann Tyrosin durch ein Enzym, das ein spezi-

fisches Atom in einer Mulde hat, das mit der OH-Gruppe des Tyrosins eine Wasserstoff-Brückenbindung eingehen kann, von Phenylalanin unterschieden werden. Hier gibt die Bildung einer spezifischen Wasserstoff-Brückenbindung ungefähr 4 bis 5 kcal/Mol an Energie ab. Diese Energie würde verlorengehen, wenn statt dessen Phenylalanin gewählt werden würde. So können wir mit Hilfe einer physikalisch-chemischen Theorie voraussagen, daß die Wahrscheinlichkeit, Tyrosin in der «Tyrosinmulde» zu finden, ungefähr 1000 mal größer ist als die Wahrscheinlichkeit, Phenylalanin in der Tyrosinmulde zu finden.

Es ist jedoch schwerer sich unmittelbar vorzustellen, wie eine ähnliche Genauigkeit erreicht werden kann, wenn zwischen Aminosäuren unterschieden werden muß, die sich nur durch einen Methylrest unterscheiden, eine Gruppe, die weder zu Salzbindungen noch zu Wasserstoff-Brückenbindungen fähig ist. Zum Beispiel muß man Glycin von Alanin und Valin von Isoleucin unterscheiden können. Es ist natürlich nicht schwierig zu verstehen, warum die größere Alanin-Seitengruppe nicht in die Mulde passen kann, die für die kleinere Aminosäure Valin bestimmt ist. Wir stoßen jedoch auf Schwierigkeiten, wenn wir fragen, warum Glycin nicht manchmal in die Alaninmulde paßt oder Valin in die Isoleucinmulde. Wenn dies geschähe, träte ein Verlust an van der Waals-Kräften ein, die durch eine genaue Anpassung um eine Methylgruppe herum entstehen. Man nimmt heute an, daß diese Kräfte ungefähr 2 bis 3 kcal/Mol betragen, alleine ein zu geringer Wert, um die übliche Genauigkeit zu erklären, mit der Aminosäuren während der Synthese von Protein angeordnet werden. Man vermutet heute, daß die maximale Häufigkeit, mit der eine falsche Aminosäure in eine wachsende Polypeptidkette eingebaut wird, ungefähr 1 in 1000 ist. Das bedeutet, daß die Energie, die gewonnen wird, indem die richtige Aminosäure ausgewählt wird, mindestens 4 bis 5 kcal sein muß, ein Wert, der ungefähr doppelt so groß ist wie der, der nur durch die van der Waals-Energie geliefert wird. Dieser Unterschied schuf anscheinend ein Paradoxon, bis man auch die relative Schwierigkeit in Betracht zog, Glycin- und Alaninmoleküle in eine wäßrige Lösung einzuführen: Die Wassermoleküle in der flüssigen Phase werden durch eine relativ regelmäßige Anordnung von Wasserstoff-Brückenbindungen ( $\text{O-H}\cdots\text{O}$ ) zusammengehalten. Praktisch alle Wasserstoff- und Sauerstoffatome im Wasser sind an Wasserstoffbrücken beteiligt. Diese Anordnung wird durch die Anwesenheit der  $\text{CH}_3$  Gruppe, die keine Wasserstoff-Brückenbindungen eingeht, gestört; die Einführung der Methylgruppe verursacht notwendigerweise den Verlust der Energie, die durch die Bildung von Wasserstoffbrücken gewonnen wird. Wir sollten daher eine wäßrige Lösung als eine Ansammlung von Molekülen betrachten, die versuchen werden, unerwünschte hydrophobe Gruppen auszuschließen. Diese Tendenz liefert die zusätzliche Energiedifferenz (2 kcal/Mol), um die richtige Auswahl

von Alanin (Isoleucin) zu ermöglichen, da ein sehr deutlicher Unterschied in der Geschwindigkeit besteht, mit der wäßrige Lösungen Alanin (Isoleucin) im Vergleich zu den besser wasserlöslichen Glycin (Valin) ausschließen.

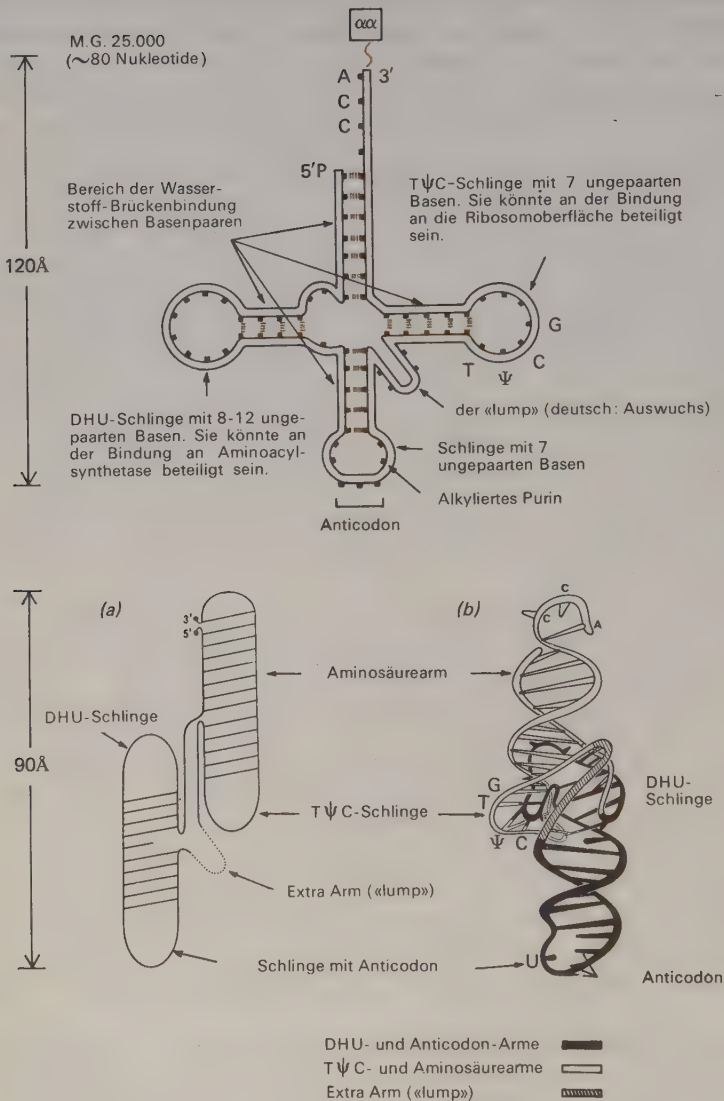
## DIE ADAPTORMOLEKÜLE SIND SELBST RNA-MOLEKÜLE

Die Moleküle, mit denen sich die Aminosäuren verbinden, bilden eine Gruppe von relativ kleinen RNA-Molekülen, die Transfer-RNA (tRNA)<sup>1</sup> genannt werden. Es ist tatsächlich nicht überraschend, daß die Adaptoren auch RNA-Moleküle sind, da ein nützlicher Adaptor vor allem die Fähigkeit haben muß, sich spezifisch an die freien Keto- und Aminogruppen der einsträngigen Matrizen RNA-Moleküle zu binden. Diese Bindung wird in idealer Weise dadurch erreicht, daß der Adaptor auch ein einsträngiges RNA-Molekül ist, da sich daraus die Möglichkeit ergibt, daß sich sehr spezifische Wasserstoffbrücken (vielleicht nach Art der Basenpaarung) bilden, die die Matriz und den Adaptor zeitweilig zusammenhalten. Die tRNA-Adaptoren für die zwanzig verschiedenen Aminosäuren haben alle verschiedene Strukturen, jede einzigartig dafür geeignet, eine andere Nukleotidsequenz an die Matriz anzufügen. Daher gibt es eine große Anzahl verschiedener Arten von tRNA.

Jede der tRNAs enthält ungefähr 80 Nukleotide (MG~25.000), die in einer einzigen kovalent gebundenen Kette miteinander verknüpft sind (Abbildung 12-1). Ein Ende der Kette (3'-Ende) endet immer mit einer CCA-Sequenz (Cytidylsäure, Cytidylsäure, Adenylsäure). Das abschließende Nukleotid des anderen Endes (5') ist für gewöhnlich Guanylsäure. Obwohl nur eine einzige Kette vorhanden ist, ist der größte Teil der Basen durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Haarnadelartige Rückfaltungen bringen die Basen auf der gleichen Kette in eine DNA-ähnliche doppelhelikale Anordnung. Dadurch wird die Bildung von Wasserstoffbrücken möglich, da die Anzahl der Adeninreste ungefähr der Anzahl der Uracilreste gleichkommt und die Anzahl der Guanine fast genau der Anzahl der Cytosine entspricht. Die Übereinstimmung ist jedoch nicht genau und einige Nukleotide, die miteinander keine Basenpaarung eingehen, sind frei und können auf die Matriz passen.

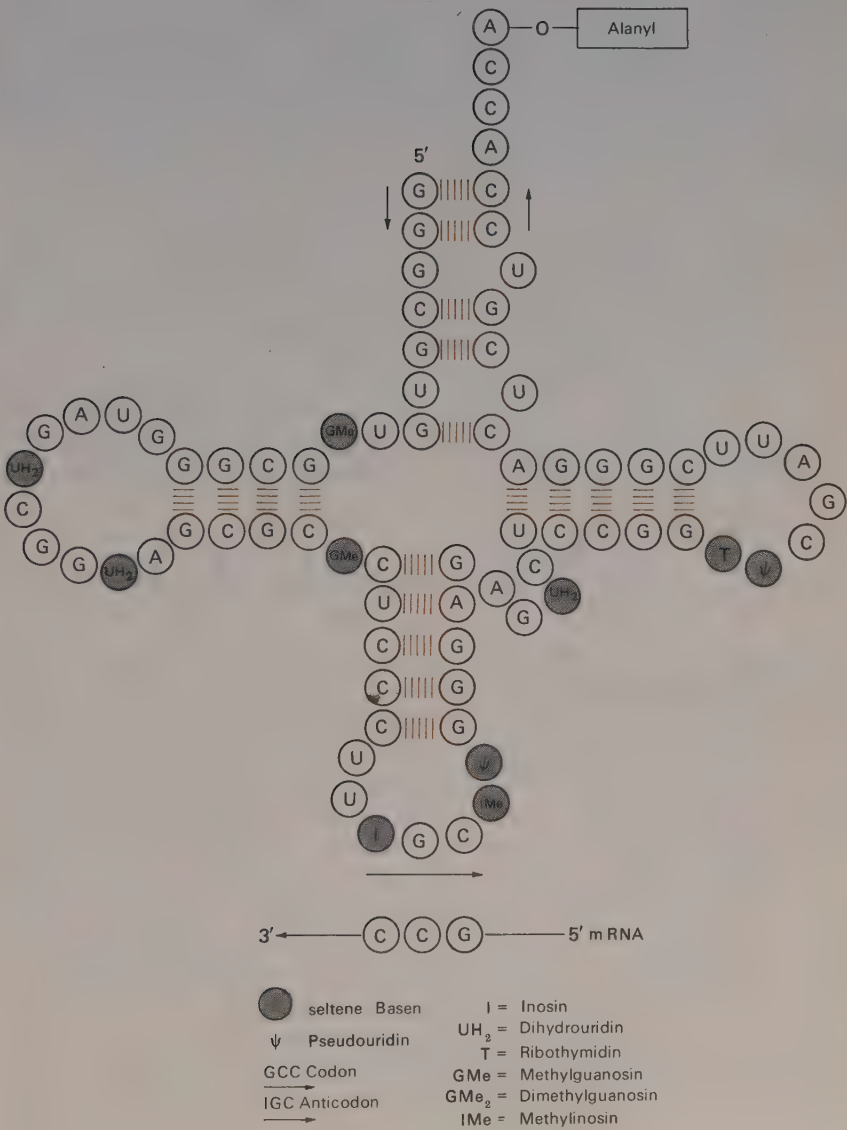
Anfangs dachte man, daß die dreidimensionale Gestalt der verschiedenen tRNAs äußerst verschieden sein könnte. Die Entdeckung, daß ein Gemisch aus allen tRNAs sehr regelmäßige dreidimensionale Kristalle bilden kann, zeigt jedoch, daß die grundlegende dreidimensionale Anordnung für alle Moleküle gleich ist.

<sup>1</sup> Einige Autoren ziehen den Ausdruck lösliche RNA (soluble RNA, sRNA) für das Adaptormolekül vor.



**ABBILDUNG 12-1** Diagramm eines Amino-Acyl tRNA Moleküls in der üblicherweise gebrauchten kleeblattförmigen Darstellung und schematische Darstellung (a) und Zeichnung (b) der vorgeschlagenen Tertiärstruktur. [Wiedergabe nach M. Levitt, Nature, 224, 759 (1969).]





**ABBILDUNG 12-2** Die gesamte Nukleotidsequenz der Alanin tRNA, die die seltenen Basen und die Position des Codons/Anticodons zeigt.

## HEFE ALANIN-tRNA ENTHÄLT 77 NUKLEOTIDE

Im Dezember 1964 wurde die erste Nukleotidsequenz eines spezifischen tRNA-Moleküls (aus Hefe) ausgearbeitet. Diese tRNA bindet sich spezifisch an Alanin und wird daher *Alanin-tRNA* genannt. Sie enthält 77 Nukleotide, die in ganz bestimmter Sequenz angeordnet sind (Abbildung 12-2). Das auffallendste an dieser Sequenz ist der hohe Gehalt (9/77) an seltenen Basen (Abbildung 12-3). («Selten» bedeutet, daß es sich um andere Basen als

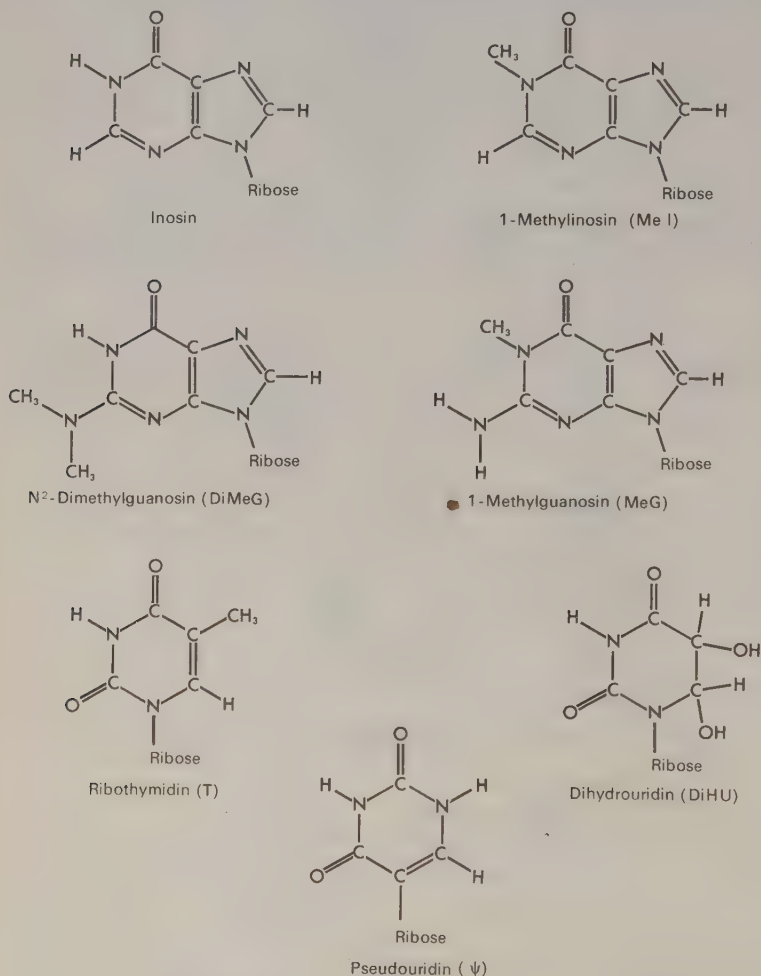


ABBILDUNG 12-3 Die Strukturen der in Hefe Alanin-tRNA gefundenen seltenen Nukleotide.

A, G, C oder U handelt.) Viele dieser seltenen Basen unterscheiden sich von normalen Basen durch die Anwesenheit einer oder mehrerer Methyl-(-CH<sup>3</sup>)-Gruppen. Die meisten, wenn nicht sogar alle, Methylgruppen werden erst enzymatisch eingeführt, nachdem die Nukleotide bereits durch 3'-5' Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft worden sind. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch die anderen seltenen Basen durch die enzymatische Veränderung eines schon bestehenden Polynukleotids entstehen.

Die Funktion der seltenen Basen ist bis jetzt noch nicht klar. Sie sind nicht auf Alanin-tRNA beschränkt, sondern treten in verschiedenem Ausmaß in allen tRNA-Molekülen auf. Unser einziger Hinweis auf ihre Rolle ist die Tatsache, daß mehrere seltene Basen keine konventionellen Basenpaarungen eingehen können. Einige der seltenen Basen könnten daher die Funktion haben, doppelhelikale Haarnadelbereiche zu zerstören und dabei freie Keto- und Aminogruppen freizusetzen, die dann schwache Wechselwirkungen eingehen können. Je nach den spezifischen Basen können die freien Gruppen schwache Wechselwirkungen mit der Matrizen-RNA, mit einem Ribosom oder mit dem Enzym, das gebraucht wird, um eine spezifische Aminosäure an ihr spezifisches tRNA-Molekül zu binden, eingehen.

### KLEEBLATTFALTUNG DER tRNA-MOLEKÜLE

Die genaue Nukleotidsequenz von Alanin-tRNA liefert nicht genügend Information, um eindeutig zu erraten, wie die verschiedenen Basen sich durch Wasserstoffbrücken aneinander binden. Wenn nur diese Struktur bekannt ist, wären mehrere mögliche Haarnadelkonfigurationen vorstellbar. Aber nachdem einige andere Hefe-tRNA Sequenzen bestimmt worden waren, erkannte man, daß bestimmte Sequenzen allen Arten der tRNA-Moleküle gemeinsam waren. Es gab nur eine Faltungsmöglichkeit für die Kette (das Kleeblatt), die eine maximale Anzahl von Basenpaaren ermöglichte und zu einer einheitlichen Form führte (Abbildung 12-1). Jedes Kleeblatt enthält die folgenden nicht über Wasserstoffbrücken gebundenen Teile:

1. Das 3'-Ende besteht aus ACC plus einem veränderlichen vierten Nukleotid. Die Aminosäure wird immer an das 3'-terminale A gebunden.
2. Wenn man sich entlang des Skeletts vom 3' Ende entfernt, trifft man auf die erste Schlinge des Kleeblatts. Sie besteht aus sieben ungepaarten Basen und enthält immer die Sequenz 5'-T-pseudo UCG-3'. Dieser Bereich könnte an der Bindung an die Oberfläche des Ribosoms beteiligt sein.
3. Als nächstes erscheint eine Schlinge von äußerst variabler Größe, die oft «lump» (deutsch «Auswuchs») genannt wird.
4. Die dritte Schlinge, die aus sieben ungepaarten Basen besteht, enthält

das Anticodon - d.h. die drei benachbarten Basen, die sich (durch Basenpaarung) mit den aufeinanderfolgenden Basen, die das Codon enthalten, verknüpfen. Das Anticodon wird an seinem 3'-Ende durch eine Purinbase an seinem 5'-Ende durch U eingeschlossen. Die Purinbase ist oft alkyliert.

5. Die vierte Schlinge enthält acht bis zwölf ungepaarte Basen und ist relativ reich an Dihydro-U. Man nimmt an, daß sie bei der Bindung an ein spezifisches aktivierendes Enzym (Aminoacyl-Synthetase) eine Rolle spielt.

In den letzten Jahren wurden die Sequenzen von tRNAs aus mehreren verschiedenen Organismen zusätzlich zur Hefe ausgearbeitet. Alle zeigen die gleichen allgemeinen Eigenschaften, die die Bildung des Kleeblatts begünstigen. Die Tatsache, daß einige Hefe-tRNA-Moleküle durch Enzyme aus ganz unverwandten Organismen aktiviert werden können (siehe unten), ist daher nicht überraschend.

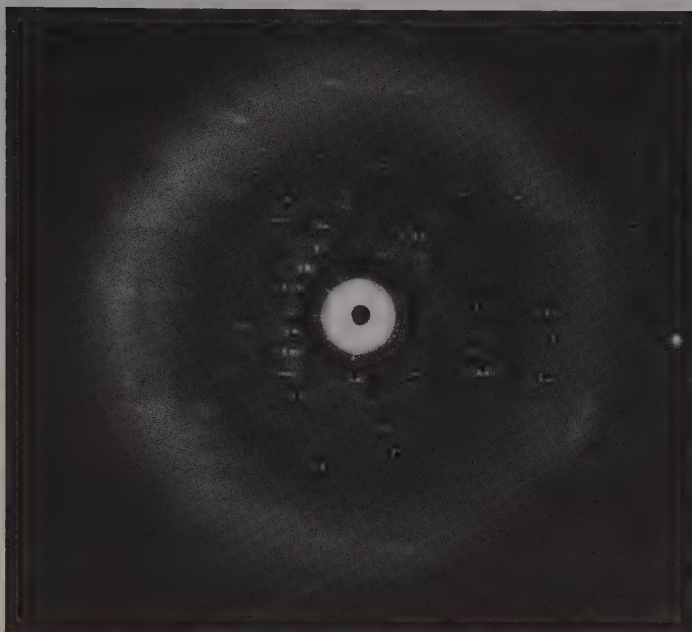
### KRISTALLINE tRNA

Die Entdeckung des Kleeblattmusters allein sagt uns nicht, wie die verschiedenen Schlingen räumlich angeordnet sind. Diese Information kann man nur aus Röntgenstrukturanalysen der tRNA Kristalle beziehen. Zum Glück war der eher hoffnungslose Eindruck vergangener Jahre, daß es unmöglich sein könnte, tRNA zu kristallisieren, unbegründet. In der Tat kann man jetzt sehr gute Kristalle vieler tRNA-Arten routinemäßig erhalten (Abbildung 12-4). Es sollte daher innerhalb der nächsten paar Jahre gelingen, ihre allgemeine Gestalt auszuarbeiten. Gewisse Hinweise, daß sich die Form ändert, sobald eine Aminosäure gebunden wird, werden es auch notwendig machen, die Struktur des tRNA-Aminosäure-Komplexes zu studieren.

### DIE BINDUNG DES ADAPTORS AKTIVIERT AUCH DIE AMINOSÄURE

Die Verbindung zwischen dem 3'-terminalen Adenosin und der Aminosäure besteht aus einer kovalenten Bindung zwischen der Aminosäure-Carboxylgruppe und dem endständigen Riboserest der RNA (Abbildung 12-5). Die Verwendung der Aminosäure-Carboxylgruppe, um den Adaptor zu binden, läßt einige interessante Folgerungen zu. Zu allererst muß der tRNA-Adaptor, freigesetzt werden, bevor die Carboxylgruppe eine Peptidbindung eingeben kann. Somit finden die Bildung der Peptidbindung und die Entfernung des Adaptors koordiniert statt. Zweitens ist die Bindung, die die tRNA mit ihrer spezifischen Aminosäure verbindet, eine energiereiche Bindung, was diese Komplexe zu «aktivierten» Vorstufen macht. Die Energie, die

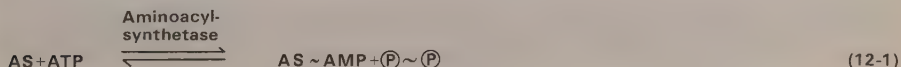




**ABBILDUNG 12-4** Röntgenbeugungsmuster eines gemischten tRNA Kristalls. Dieser Kristall wurde durch Ko-Kristallisation eines nicht fraktionierten tRNA-Präparats aus Hefe gebildet. Die Fähigkeit des nicht fraktionierten Materials, so regelmäßig zu kristallisieren (die Reflexionen reichen bis zu ungefähr 10 Å, in anderen Photographien wurde eine Auflösung bis zu 3 Å beobachtet), zeigt an, daß die Gestalt aller tRNA Arten sehr ähnlich ist. [Von Blake, Fresco und Langridge, *Nature*, **225**, 32 (1970). Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. Robert Langridge, Princeton University, zur Verfügung gestellt.]

in der Aminosäure-tRNA Bindung (eine Aminoacyl-Bindung) steckt, kann für die Bildung der Peptidbindung, die eine niedrigere Energie hat, verwendet werden.

Die für die Bildung der Aminoacyl-Bindung benötigte Energie kommt von einer energiereichen Pyrophosphatbindung ( $\text{P} \sim \text{P}$ ) im ATP. Vor der Bildung der AS~tRNA-Verbindungen werden die Aminosäuren durch Enzyme (Aminoacyl-Synthetasen) aktiviert und bilden Aminosäure-adenylate (AS~AMP), in denen die Carboxylgruppe der Aminosäure durch energiereiche Bindungen an eine Adenylsäure (AMP) Gruppe gebunden ist (Abbildung 12-5).



Das AS ~ AMP-Zwischenprodukt bleibt normalerweise mit dem aktivierenden Enzym bis zur Kollision mit einem für die Aminosäure spezifischen tRNA-Molekül eng verbunden. Dann transferiert das gleiche aktivierende Enzym die Aminosäure auf den abschließenden Adenyssäurerest der tRNA.



Wir erkennen daraus, daß die aktivierenden Enzyme fähig sind, sowohl eine bestimmte Aminosäure als auch ihren tRNA-Adaptor spezifisch zu erkennen (sich mit ihnen zu verbinden). Zu diesem Zweck müssen die Enzyme zwei verschiedene Bindungsstellen haben: eine, die die Seitengruppe einer Aminosäure erkennt und eine andere, die die für diese Aminosäure spezifische tRNA erkennt. Ebenso muß jedes tRNA-Molekül zwei spezifische Erkennungsstellen haben: die eine für sein aktivierendes Enzym, die andere für eine spezifische Gruppe von Matrizen nukleotiden. Daraus ergibt sich, daß die Aminosäure-Seitengruppe selbst nie mit einem Matrizenmolekül in Kontakt kommen muß. Sie braucht sich nur spezifisch mit dem richtigen Aktivierungsenzym zu verbinden.

Jede Zelle benötigt mindestens zwanzig verschiedene Arten von Aktivierungsenzymen und mindestens zwanzig Arten von tRNA-Molekülen. Es muß zumindest eines von jedem für jede Aminosäure vorhanden sein. Anfangs nahm man an, daß nur zwanzig verschiedene tRNA-Moleküle verwendet würden, aber jetzt ist klar, daß es einige Fälle gibt, in denen zumindest zwei verschiedene Arten von tRNA-Molekülen für dieselbe Aminosäure spezifisch sind. Das ist mit der Tatsache verbunden, daß der genetische Code oft mehr als eine Nukleotidsequenz (Codon) für eine bestimmte Aminosäure verwendet (Degenerierung; vergleiche Kapitel 13). Häufig gibt es ein eigenes tRNA-Molekül für jedes funktionelle Codon. Es braucht jedoch kein separates Aktivierungsenzym für jede der verschiedenen tRNAs vorhanden zu sein, die einer bestimmten Aminosäure entsprechen. Da sich die tRNA an zwei distinkten Stellen mit den Matrizen und den Aktivierungsenzymen verbindet, können tRNA-Moleküle, die sich durch ihre matrizenbindenden Nukleotide unterscheiden, in dem Bereich, der sich mit dem Enzym verbindet, identische Nukleotidsequenzen besitzen. Daher können sich tRNA-Moleküle, die sich an verschiedene Codons binden, an das gleiche Aktivierungsenzym binden.

## DIE BILDUNG VON PEPTIDBINDUNGEN FINDET AN RIBOSOMEN STATT

Sobald die Aminosäuren ihre Adaptoren erhalten haben, diffundieren sie zu den Ribosomen, den kugelförmigen Partikeln, auf denen die Synthese

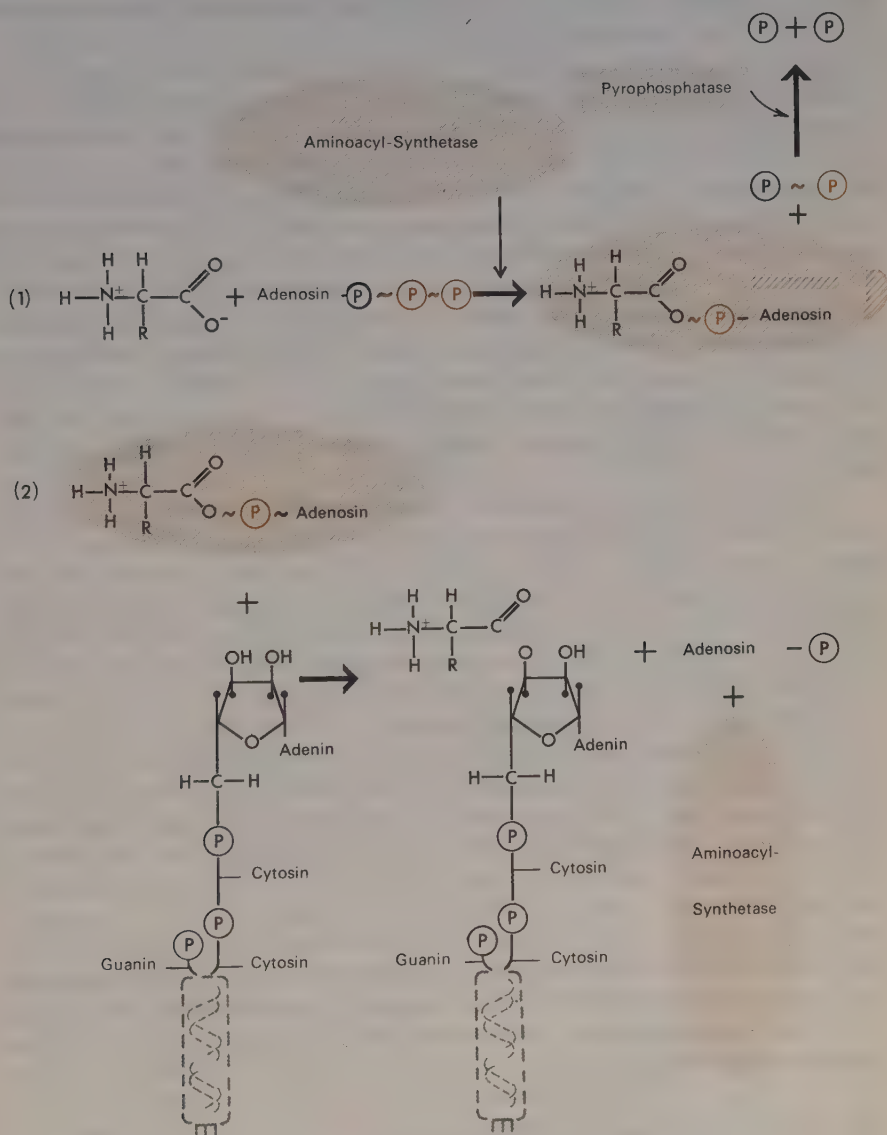


ABBILDUNG 12-5 Aktivierung einer Aminosäure durch ATP und Transfer auf das CCA-Ende ihres spezifischen tRNA-Adaptors.

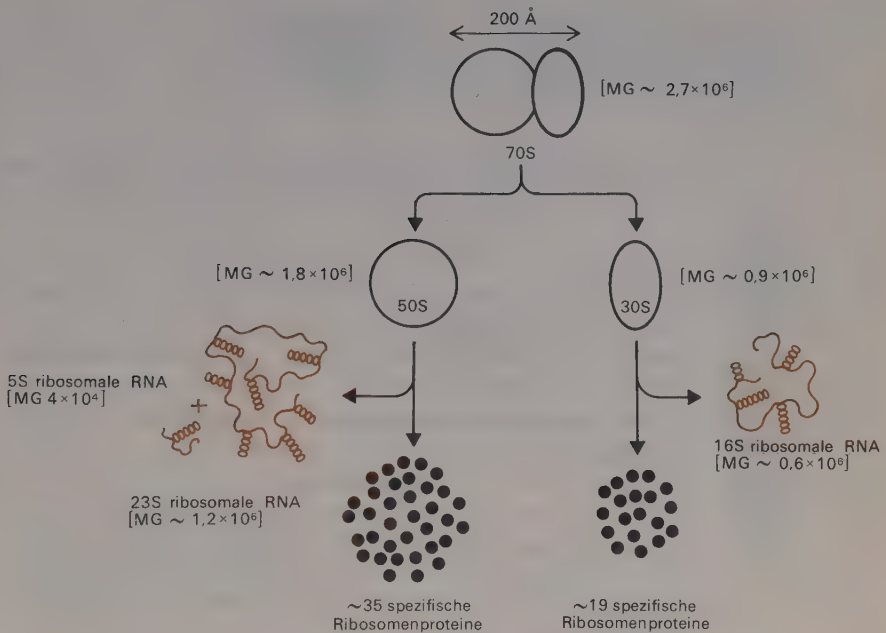
von Protein stattfindet. Die Proteinsynthese läuft nie frei in Lösung ab, sondern nur an der Oberfläche von Ribosomen, die man als Miniaturfabriken für die Herstellung von Protein ansehen könnte. Ihre hauptsächliche Aufgabe ist es, die hereinkommenden AS~tRNA-Vorläufer und die Matrizen so zu orientieren, daß der genetische Code genau gelesen werden kann. Ribosomen enthalten also spezifische Oberflächen, die die Matrizen-RNA, die AS~tRNA-Vorläufer und die wachsende Polypeptidkette an den geeigneten stereochemischen Stellen binden. In einer schnell wachsenden *E. coli* Zelle gibt es ungefähr 15.000 Ribosomen. Jedes Ribosom hat ein Molekulargewicht von etwas unter 3 Millionen. Zusammen machen die Ribosomen ungefähr ein Viertel der gesamten Zellmasse aus, somit ist ein ziemlich großer Teil der gesamten zellulären Synthese mit der Aufgabe beschäftigt, Proteine zu erzeugen. Auf einem einzigen Ribosom kann zu einer bestimmten Zeit nur eine einzige Polypeptidkette gebildet werden. Unter optimalen Bedingungen erfordert die Herstellung einer Kette vom MG = 40.000 ungefähr zehn Sekunden. Die fertige Polypeptidkette wird dann freigesetzt und das freie Ribosom kann sofort verwendet werden, um ein anderes Protein zu synthetisieren.

Alle Ribosomen sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die größere Untereinheit ist ungefähr doppelt so groß wie die kleinere (Abbildung 12-6). Beide Untereinheiten enthalten sowohl RNA als auch Protein. Bei den *E. coli* Ribosomen ist das Verhältnis RNA/Protein ungefähr 2:1; in vielen anderen Organismen ist es ungefähr 1:1. Der Großteil des Proteins hat strukturelle Aufgaben (im Gegensatz zu enzymatischen Aufgaben). Sowohl die großen als auch die kleinen Untereinheiten enthalten eine große Anzahl verschiedener Proteine, deren hauptsächliche Funktion darin besteht, dabei zu helfen, die Matrizen-RNA und die AS~tRNA-Vorläufer richtig zusammenzubringen. Bis jetzt wurden nur die ribosomalen Proteine aus *E. coli* intensiv untersucht. Alle neunzehn Proteine der kleineren Untereinheit (30 S) wurden charakterisiert (Abbildung 12-7) und zeigen viele verschiedene Größen. Von den meisten, wenn nicht sogar von allen, ist in jedem Ribosom nur ein Exemplar vorhanden. Die Charakterisierung der 35 Proteine in den größeren 50S Untereinheiten ist weniger vollständig. Es scheint jedoch, daß, wie bei den 30S Proteinen, die meisten nur einmal in einem bestimmten Ribosom vorhanden sind. Ribosomen sind daher bemerkenswert komplizierte Strukturen, deren vollständige chemische Charakterisierung noch Jahrzehnte auf sich warten lassen könnte.

## DIE REKONSTITUTION VON RIBOSOMEN

Vor kurzer Zeit ist der vollständige Zusammenbau der kleineren Untereinheit aus ihren RNA- und Proteinbestandteilen gelungen. Diese rekonstituierten

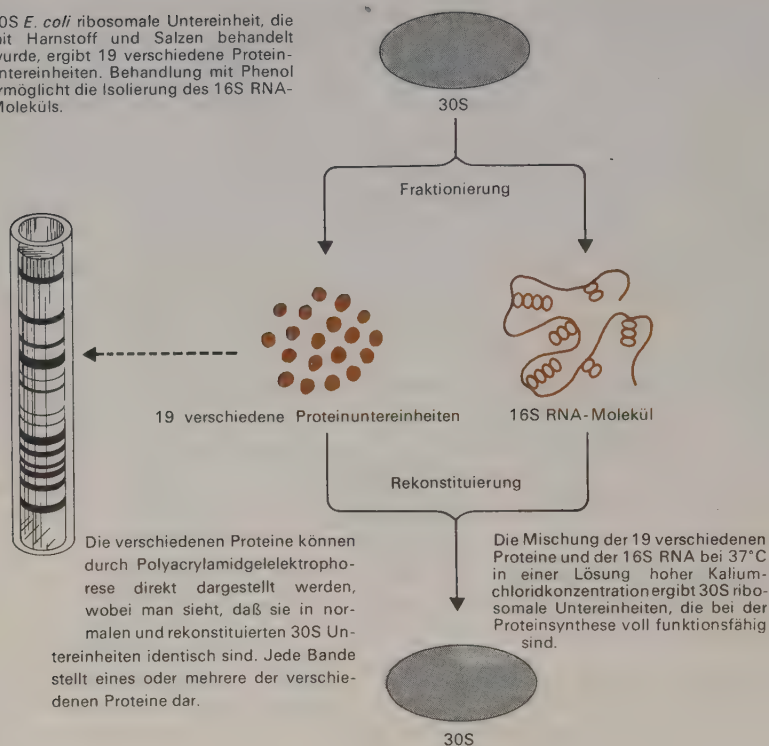




**ABBILDUNG 12-6** Die Struktur des *E. coli* Ribosoms. Es wird gewöhnlich das 70S Ribosom genannt, da 70S (Svedbergs) ein Maß (die Sedimentationskonstante) dafür ist, wie schnell das Ribosom in der Zentrifuge sedimentiert. Ebenso entsprechen die Bezeichnungen 30S und 50S den Sedimentationskonstanten der kleineren und größeren ribosomalen Untereinheiten; 16S und 23S sind die Sedimentationskonstanten der kleineren und größeren ribosomalen RNA-Moleküle. Alle bakteriellen Ribosomen entsprechen in ihrem Größen ungefähr denen von *E. coli* und besitzen 30S und 50S Untereinheiten. In höheren Organismen (einschließlich Hefe, etc.) sind die Ribosomen etwas größer (80S), mit 40S und 60S Untereinheiten. Der Einfachheit halber werden wir 30S benutzen, um alle kleineren Partikeln, und 50S, um alle größeren Partikeln zu bezeichnen.

Partikeln sind bei der Proteinsynthese aktiv und zeigen das gleiche Verhalten wie die normalen 30S Untereinheiten. Während für die größeren Untereinheiten eine vollständige Rekonstitution bis jetzt noch nicht geglückt ist, scheint es keinen triftigen Grund zu geben, warum das nicht sehr bald geschehen sollte. Die richtigen Bedingungen für die Rekonstitution zu finden, wäre ein wichtiger Erfolg, der die Möglichkeit eröffnen würde, Partikeln zu präparieren, denen ein oder mehrere spezifische Proteine fehlen; man könnte dann die Auswirkungen beobachten, die ihre Abwesenheit auf spezifische ribosomale Funktionen hat (z.B., Bindung der tRNA, Bildung von Peptidbindung, etc.).

30S *E. coli* ribosomale Untereinheit, die mit Harnstoff und Salzen behandelt wurde, ergibt 19 verschiedene Proteinuntereinheiten. Behandlung mit Phenol ermöglicht die Isolierung des 16S RNA-Moleküls.



**ABBILDUNG 12-7** *Rekonstitution des 30S Ribosoms aus einem Gemisch von 19 ribosomalen Proteinen und einem 16S-rRNA-Molekül.*

## MIT RIBOSOMEN VERBUNDENE RNA ENTHÄLT FÜR GEWÖHNLICH KEINE GENETISCHE INFORMATION

Als man erkannte, daß Ribosomen bei der Proteinsynthese eine Rolle spielen (1953), glaubte man anfangs natürlicherweise, daß ihre fest gebundene RNA-Komponente die Matrize wäre, die die Aminosäuresequenz bestimmte. Tatsächlich nahm man am Anfang an, daß die gesamte zelluläre RNA ihren Sitz in den Ribosomen hätte und daß der leichtere, langsamer sedimentierende, lösliche Anteil (~ 20 Prozent der gesamten RNA) ein Abbauprodukt der ribosomalen RNA-Matrizen wäre. Durch die Identifizierung (1956) des löslichen RNA Anteils als Adaptormoleküle wurde diese irrige Annahme berichtigt, aber sie räumte nicht mit dem Glauben auf, daß die gesamten

verbleibenden 80 Prozent der zellulären RNA als Matrizen wirkten. 1960 jedoch wurde zweifelsfrei bewiesen, daß aus gereinigten Ribosomen isolierte RNA (rRNA oder ribosomale RNA) keine Rolle als Matrizie spielt.

### **MATRIZEN RNA (mRNA) VERBINDET SICH REVERSIBEL MIT RIBOSOMEN**

Im Gegensatz zur obigen Annahme machen aktive Matrizen jedoch nur einen kleinen Anteil der RNA aus: nur ein bis mehrere Prozent der gesamten RNA. Diese RNA bindet sich reversibel an die Oberfläche der kleineren ribosomalen Untereinheiten und kann in Medien von geringer  $Mg^{2+}$ -Ionen-Konzentration entfernt werden, ohne daß die Integrität der Ribosomen in Mitleidenschaft gezogen wird. Da sie die genetische Information benötigt werden (wegen weiterer Details siehe Kapitel 15). Viele Biochemiker waren daher überrascht, als man 1959 entdeckte, daß nach T2 Infektion auf den Ribosomen wandert, an denen die Proteinsynthese stattfindet, bringt sie aufeinanderfolgende Codons in Position, um die geeigneten AS~tRNA-Vorstufen auszuwählen. Die Existenz der mRNA wurde zum ersten Mal eindeutig in Versuchen mit T2-infizierten *E. coli* Zellen nachgewiesen. Nachdem T2 DNA in eine Wirtszelle eingedrungen ist, muß sie RNA-Matrizen für die vielen virusspezifischen Proteine herstellen, die für die Virusreproduktion benötigt werden (wegen weiterer Details siehe Kapitel 15). Viele Biochemiker waren daher überrascht, als man 1959 entdeckte, daß nach T2 Infektion keine neuen rRNA-Ketten und somit keine neuen Ribosomen synthetisiert wurden. Dieses Ergebnis konnte nur bedeuten, daß T2-spezifische Proteine nicht auf rRNA-Matrizen synthetisiert werden; es wies weiter darauf hin, daß rRNA-Ketten vielleicht auch in normalen Zellen nicht die Matrizen für die Proteinsynthese sind. Untersuchungen, die begonnen wurden, als das T2 Resultat bekannt wurde, führten rasch zum Nachweis von mRNA, zuerst in Virus infizierten Zellen und bald darauf in normalen *E. coli* Zellen.

### **rRNA KOMMT IN ZWEI BESONDERS WICHTIGEN GRÖSSENKLASSEN VOR**

In allen bakteriellen Ribosomen findet man zwei besonders wichtige Größenklassen von rRNA. Sie sind ein integraler Bestandteil und können, zum Unterschied von mRNA, nicht ohne vollständigen Zusammenbruch der Struktur des Ribosoms entfernt werden. Das kleinere rRNA-Molekül, das in der kleineren ribosomalen Untereinheit zu finden ist, hat ein Molekulargewicht von ungefähr einer halben Million, während das größere Molekül,

ein Bestandteil der größeren ribosomalen Untereinheit, ein Molekulargewicht von ungefähr einer Million hat. Zusätzlich enthält jede größere Untereinheit ein sehr kurzes rRNA-Molekül, das bei 5S sedimentiert. Alle sind einsträngig und enthalten ungleiche Mengen von Guanin und Cytosin und von Adenin und Uracil. Nichtsdestoweniger ist die Zahl paarungsfähiger Basen ziemlich ausgewogen, sodaß viele rRNA-Basen auf derselben Kette durch Wasserstoffbrücken verbunden sind, was zu haarnadelartigen Schlingen führt, wie man sie in tRNA findet. Die gleichzeitige Anwesenheit von einsträngigen und doppelhelikalen Bereichen gibt den einzelnen rRNA-Molekülen eine unregelmäßige 3D-Gestalt. Daher ist es bis jetzt noch nicht möglich gewesen, rRNA-Präparate zu gewinnen, in denen die Moleküle regelmäßig im Raum angeordnet sind. Die Röntgen-Beugungsaufnahmen der rRNA sind deshalb wesentlich verzerrter als die entsprechenden DNA-Diagramme und geben keinen Aufschluß über die genauen Details der rRNA Struktur. Ähnliche Probleme bestehen wahrscheinlich bei der Aufklärung der mRNA-Moleküle durch Röntgenstrukturanalyse.

#### **DIE FUNKTION DER rRNA IST NOCH NICHT BEKANNT**

Obwohl Rekonstitutionsversuche möglich sind, ist die Funktion der rRNA noch immer ziemlich geheimnisvoll. Derzeit gib es nicht einmal eine halbwegs befriedigende Hypothese, warum Ribosomen sowohl rRNA als auch Protein enthalten. Ein Grund mag teilweise darin liegen, daß die ungepaarten Basen der rRNA auf irgendeine Weise bei der Bindung von tRNA und mRNA an die Ribosomen eine Rolle spielen. In der Zelle wird ein Großteil der negativen Phosphatladung der RNA durch  $Mg^{2+}$ -Ionen neutralisiert. Es ist möglich, daß die divalenten  $Mg^{2+}$ -Ionen manchmal zwischen mRNA und rRNA, oder zwischen mRNA und tRNA, temporär Brücken bilden und dabei mithelfen, ihre Bestandteile während der Polypeptidsynthese korrekt ausgerichtet zu halten.

#### **ALLE DREI ARTEN VON RNA WERDEN AUF DNA-MATRIZEN HERGESTELLT**

Da sowohl tRNA als auch rRNA-Ketten jeweils eine sehr spezielle Rolle bei der Proteinsynthese spielen, wurde (vor einigen Jahren) vorgeschlagen, daß diese Arten von RNA vielleicht nicht an DNA-Matrizen hergestellt würden, sondern, wie die RNA in den einsträngigen RNA Viren, selbstreplizierend wären (vergleiche Kapitel 15). Durch DNA-RNA-Hybridisierungsversuche wurde die Unrichtigkeit dieser Vorstellung bewiesen. Bei diesen



Versuchen werden rRNA (oder tRNA)-Ketten bei hohen Temperaturen (nahe 100°C) mit DNA, die aus demselben Organismus gewonnen wurde, gemischt. Bei diesen Temperaturen fallen die doppelhelikalen Regionen der rRNA (tRNA) auseinander. Ebenso lösen sich alle Wasserstoffbrücken der DNA und die Komplementärstränge trennen sich. Wenn die Temperatur dann langsam gesenkt wird, bilden sich wieder stabile Doppelhelices. Zusätzlich zur Neubildung vieler komplementärer DNA-Doppelhelices verbinden sich einige einzelne DNA-Stränge spezifisch mit rRNA (tRNA)-Ketten, unter Bildung hybrider DNA-RNA-Helices. Diese DNA-RNA Komplexe sind sehr spezifisch, denn sie bilden sich nicht, wenn DNA einer nichtverwandten Art verwendet wird. Somit werden tRNA und rRNA genau wie mRNA unter Verwendung von DNA-Molekülen als Matrizen synthetisiert. Es ist sehr interessant, daß, obwohl rRNA und tRNA zusammen über 98 Prozent aller RNA ausmachen, weniger als 1 Prozent der gesamten DNA als Matrizen für sie wirkt.

Es gibt wahrscheinlich nur eine einzige spezifische Sequenz von DNA Nukleotiden (ein Gen), die für jede der 30 oder 40 verschiedenen tRNA-Moleküle codiert. Im Gegensatz dazu scheinen sowohl die größeren als auch die kleineren rRNA-Ketten durch einige Gene codiert zu werden. Ob jedes dieser verschiedenen Gene für die kleine oder große rRNA identische Nukleotidsequenzen hat, ist nicht bekannt. Sicherlich können sie keine extrem unterschiedlichen Sequenzen besitzen, da ihre rRNA Produkte sehr ähnliche 3D-Gestalt haben müssen, um in ein Ribosom zu passen.

Die Verwendung von DNA zur Codierung von tRNA (und von rRNA, falls zukünftige Experimente ergeben, daß sie nie die Rolle einer Matrize annimmt) zeigt uns, daß nicht alle Gene spezifische Aminosäuresequenzen codieren müssen. Daher müssen wir uns fragen, ob andere Arten von RNA, die bis jetzt noch nicht entdeckt wurden, wichtige metabolische Funktionen haben könnten. Sicherlich kann man heute nicht automatisch annehmen, daß für jedes Gen ein entsprechendes Protein existiert.

## mRNA-MOLEKÜLE SIND IN VIELEN VERSCHIEDENEN GRÖSSEN VORHANDEN

Im Gegensatz zu tRNA-Molekülen, die Molekulargewichte von ungefähr  $2,5 \times 10^4$  haben, und zu rRNA-Molekülen, deren Molekulargewicht entweder  $5 \times 10^5$  oder  $10^6$  ist, variieren mRNA-Moleküle stark in ihrer Länge und daher auch in ihrem Molekulargewicht. Ein Teil dieser Heterogenität reflektiert die weite Spanne in der Länge der Polypeptidketten-Produkte. Nur wenige Polypeptidketten enthalten weniger als 100 Aminosäuren und so müssen fast alle Moleküle mindestens  $100 \times 3$  Nukleotide enthalten (da

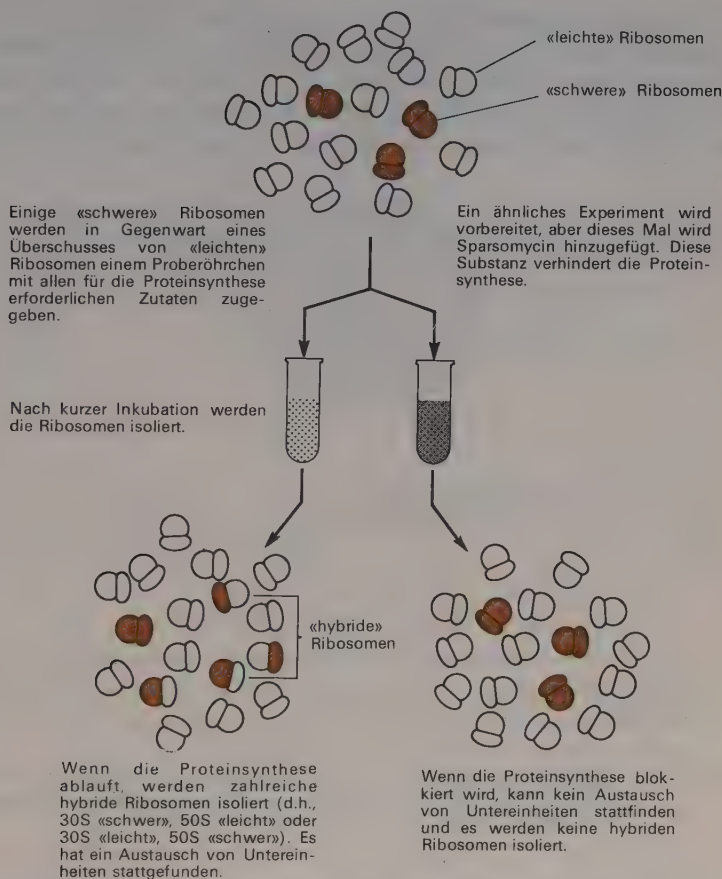
t-RNA  
Synth

drei Nukleotide ein Codon darstellen). In *E. coli* ist die durchschnittliche Größe der mRNA 900 bis 1500 Nukleotide, was mit der Tatsache übereinstimmt, daß die durchschnittliche *E. coli* Polypeptidkette 300 bis 500 Aminosäuren enthält.

Einige Moleküle codieren jedoch mehr als eine Polypeptidkette. Ihre Länge ist die Summe der Kettenlängen, die benötigt werden, um jedes der Proteine zu codieren, für das sie als Matrize dienen. Diese Summierung ist ein weiterer Grund für die Verschiedenheit in der mRNA-Kettenlänge. In den meisten, wenn nicht sogar in allen dieser polygenen messenger (Boten) haben die Polypeptidprodukte verwandte Funktionen. Zum Beispiel existiert ein mRNA-Molekül, das die zehn spezifischen Enzyme codiert, die für die Synthese der Aminosäure Histidin benötigt werden. Es enthält ungefähr 12.000 Nukleotide ( $MG \sim 4.000.000$ ) oder durchschnittlich 1200 Nukleotide zur Codierung jedes einzelnen Enzyms.

## TRIBOSOMEN TRENNEN SICH WÄHREND DER PROTEINSYNTHESE IN IHRE UNTEREINHEITEN AUF

Der Aufbau aller Ribosomen aus leicht dissoziierbaren Untereinheiten deutete auf einen Zyklus hin, während dessen große und kleine Untereinheiten sich in irgendeinem Stadium der Proteinsynthese voneinander trennen. Diese Annahme wurde vor kurzer Zeit durch Versuche an *E. coli* und Hefe bestätigt, die zeigen, daß die meisten Ribosomen ständig zu Untereinheiten dissoziieren und sich wieder neu bilden. Zellwachstum in schweren Isotopen, gefolgt von einem Transfer in ein leichtes Medium war die Methode, mit deren Hilfe diese Frage entschieden wurde. Bald nach Transfer in das leichtere Medium treten hybride (schwere 50S-leichte 30S, leichte 50S-schwere 30S) Ribosomen auf; die Geschwindigkeit ihres Auftretens läßt vermuten, daß sich die Untereinheiten einmal während jedes Zyklus der Polypeptidsynthese austauschen. Die Bestätigung für diese Annahme kommt von *in vitro* Untersuchungen der Proteinsynthese (vergleiche nächstes Kapitel), wobei das Schicksal «schwerer» Ribosomen in Gegenwart eines großen Überschusses an leichten Ribosomen verfolgt werden kann. Innerhalb ungefähr einer Minute (der Zeit, die notwendig ist, um eine vollständige Polypeptidkette zu synthetisieren) verschwinden fast alle schweren Ribosomen und gleichzeitig treten hybride Ribosomen auf (Abbildung 12-8). Der Austausch von Untereinheiten ist streng abhängig von der Synthese von Protein was durch *in vitro* Experimente mit dem Antibiotikum Sparsomycin bestätigt wird. Diese Verbindung, die die Verlängerung (Elongation) von Polypeptidketten blockiert, verhindert auch jeden Austausch von Untereinheiten.



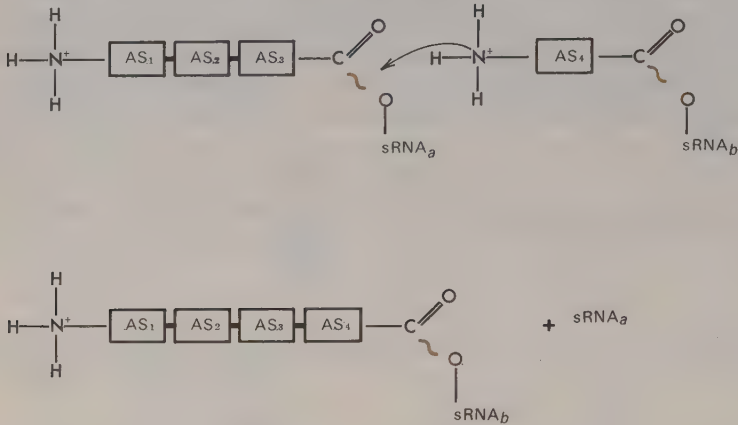
**ABBILDUNG 12-8** *Strenge Abhängigkeit des Austausches von Untereinheiten von der Proteinsynthese.*

Es ist bis jetzt noch nicht sicher bekannt, ob sich die Untereinheiten gleichzeitig mit der Fertigstellung eines neuen Polypeptids trennen oder ob sie von einem mRNA-Molekül in Form eines 70S Ribosoms kommen, das in der Folge in seine Untereinheiten dissoziiert.

#### DAS WACHSTUM DER POLYPEPTIDKETTEN BEGINNT AM AMINOTERMINALEN ENDE

An einem Ende einer vollständigen Polypeptidkette ist eine Aminosäure, die eine freie Carboxylgruppe trägt, am anderen Ende eine Aminosäure

mit einer freien Aminogruppe. Ketten wachsen immer durch die schrittweise Anknüpfung einzelner Aminosäuren; sie beginnen mit dem Aminoende und enden mit dem Carboxylende (Abbildung 12-9). Das wird deutlich dadurch gezeigt, daß man Hämoglobin-synthetisierende Retikulozyten für kurze Zeit radioaktiv markierten Aminosäuren aussetzt und sofort darauf neu herge-



(Peptidbindungen zwischen Aminosäuren sind durch einen dicken Strich gekennzeichnet.)

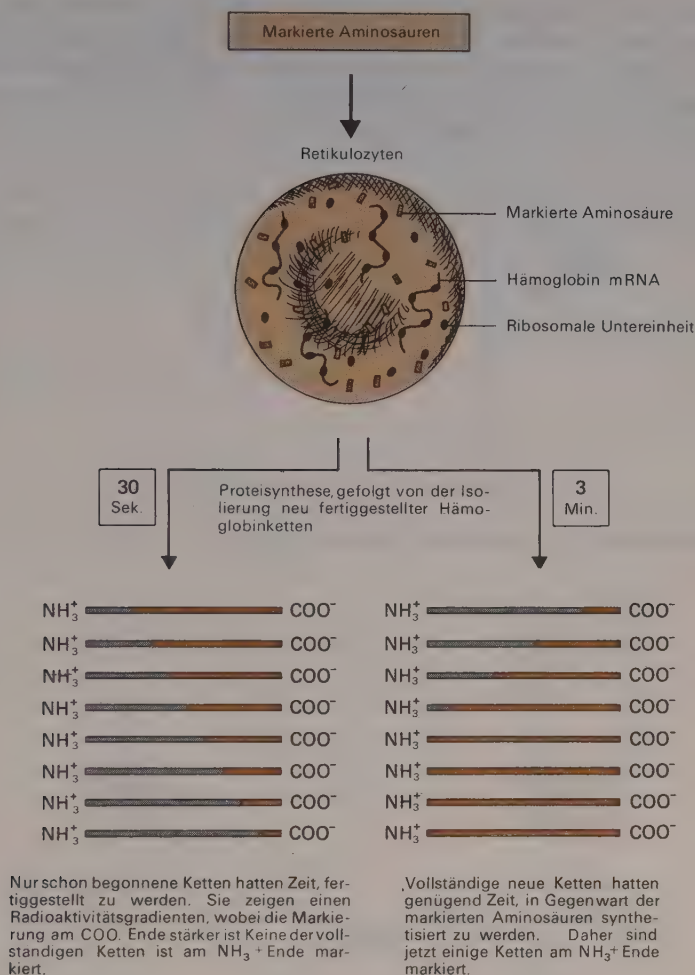
**ABBILDUNG 12-9** Schrittweises Wachstum einer Polypeptidkette. Die Initiation findet am freien  $\text{NH}_3^+$  Ende statt; der carboxyle Wachstumspunkt am Carboxylende wird durch ein tRNA-Molekül abgeschlossen.

stellte Hämoglobinketten isoliert. In den Aminosäuren des aminoterminalen Endes ist sehr wenig Radioaktivität festzustellen, der größte Teil wird in den Aminosäuren des Carboxylendes gefunden (Abbildung 12-10). Außerdem kann man einen deutlichen Gradienten steigender Radioaktivität beobachten, wenn man vom Amino- zum Carboxylende geht.

#### ALLE BAKTERIELLEN POLYPEPTIDKETTEN BEGINNEN MIT N-FORMYL-METHIONIN

Vor einigen Jahren stellte sich heraus, daß die erste Aminosäure bei der Synthese aller bakterieller Polypeptide N-Formyl-methionin ist, ein modifiziertes Methionin, in dem eine Formylgruppe an die abschließende Aminogruppe gebunden ist (Abbildung 12-11). Eine blockierte Aminosäure wie





**ABBILDUNG 12-10** Experimenteller Nachweis, daß Hämoglobinketten in Richtung  $\text{NH}_3 \rightarrow \text{COOH}$  wachsen.

N-Formyl-methionin kann nur für den Beginn der Proteinsynthese verwendet werden. Das Fehlen einer freien Aminogruppe würde verhindern, daß diese Aminosäure während der Kettenverlängerung eingebaut wird. Die Formylgruppe wird enzymatisch an Methionin gebunden, nachdem sich Methionin an seinen tRNA-Adaptor angeheftet hat.

Es können nicht alle Methionin-tRNA-Moleküle formyliert werden, son-

dern es existieren zwei Arten von Met-tRNA, von denen nur eine die Formylierungsreaktion gestattet. Kürzlich fertiggestellte Sequenzanalysen dieser beiden Met-tRNA zeigen, daß sie die gleichen Anticodonsequenzen haben (Abbildung 12-12), was das Problem aufwirft, wie das gleiche Codon (AUG) zwei verschiedene Aminosäuren codieren kann.

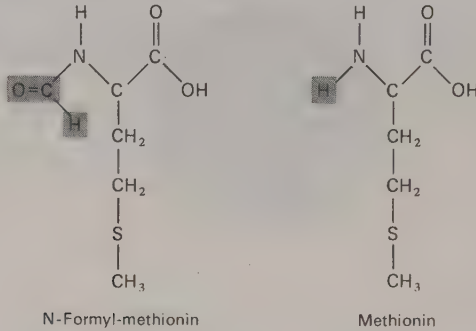


ABBILDUNG 12-11 Die Struktur von N-Formyl-methionin.

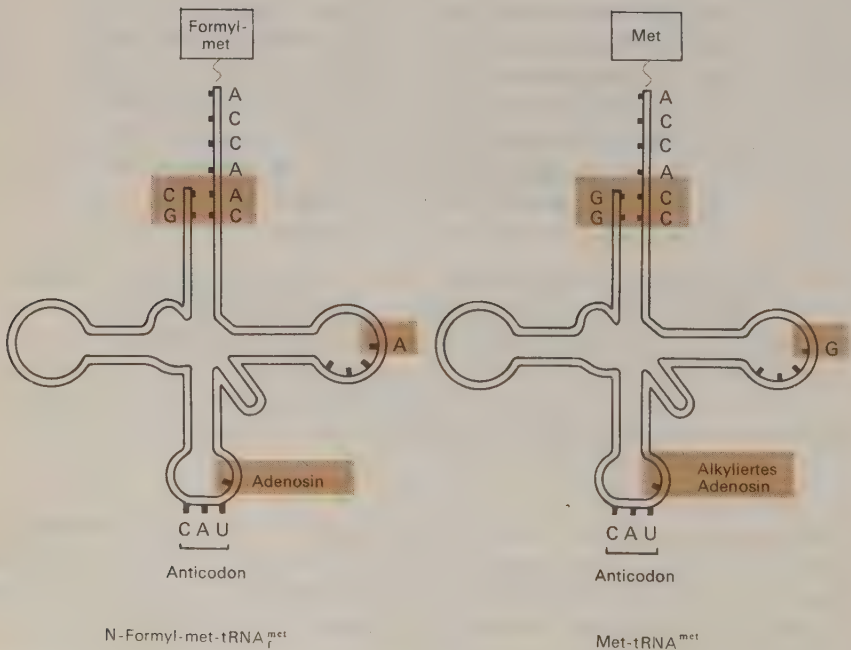
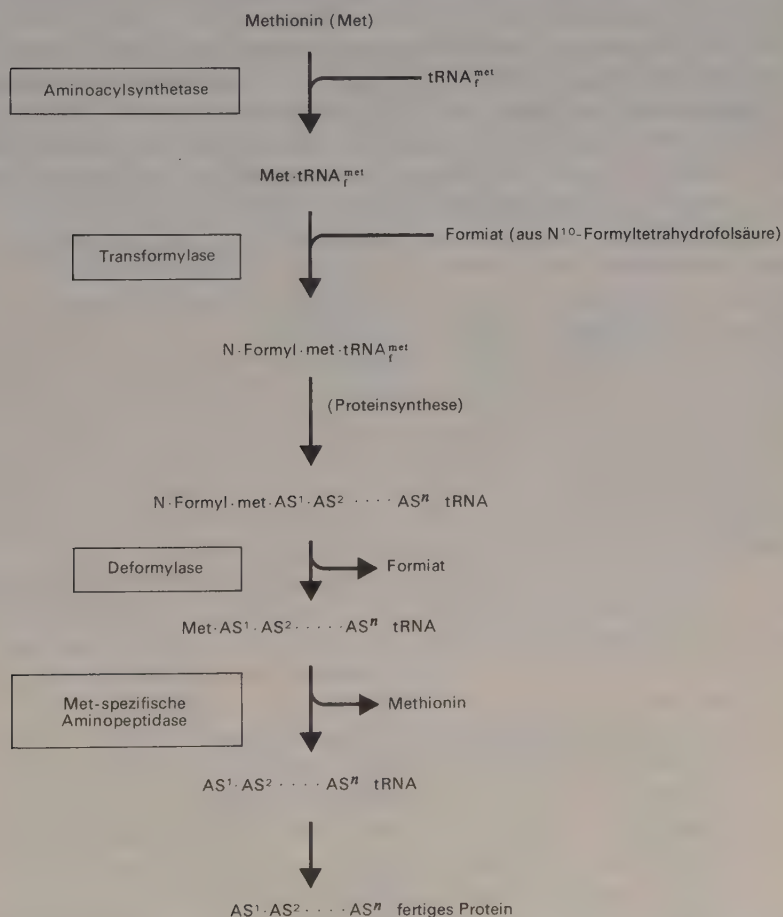


ABBILDUNG 12-12 Die drei Hauptunterschiede zwischen N-Formyl-met-tRNA und Met-tRNA.

Die Entdeckung, daß die Synthese von bakteriellem Protein mit einer blockierten Aminosäure beginnt, war höchst unerwartet, da die Isolierung reiner Proteine aus wachsenden Bakterien praktisch keine formylierten Endgruppen erkennen ließ. Das bedeutet, daß ein Enzym vorhanden ist, das die Formylgruppe sehr bald nach Synthesebeginn aus der wachsenden Kette entfernt (Abbildung 12-13). Zusätzlich gibt es noch ein anderes Enzym (eine Aminopeptidase), das in der Folge das abschließende Methionin aus vielen Proteinen entfernt. Es wirkt nicht auf alle Proteine, daher beginnt ein großer Teil der bakteriellen Proteine mit Methionin.



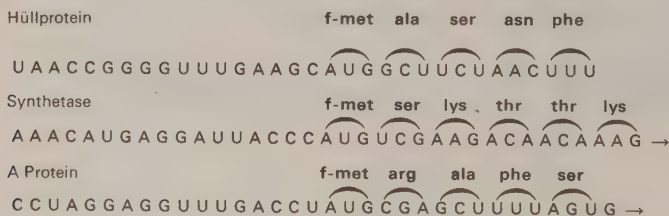
**ABBILDUNG 12-13** Enzymatische Schritte, die bei der Initiation der Proteinsynthese mit Formyl-methionin eine Rolle spielen.

Unsere Kenntnis über die Initiierung der Proteinsynthese ist weniger klar für jene Organismen, deren Zellen getrennte Kerne und 80S Ribosomen enthalten (eukaryotisch zum Unterschied von prokaryotisch). Obwohl Hinweise dafür vorhanden sind, daß auch hier die Synthese mit Methionin beginnt, scheint es nicht durch eine Formylgruppe blockiert zu sein. Weitere Untersuchungen sollten diese Frage bald klären.

#### BINDUNG DER KLEINEREN RIBOSOMALEN UNTEREINHEITEN AN SPEZIFISCHE STELLEN AUF mRNA-MOLEKÜLEN

Die Initiierung beginnt mit der Bildung eines Komplexes zwischen der kleineren 30S ribosomalen Untereinheit, f-Met-tRNA, und einem mRNA-Molekül. Daran heften sich dann die 50S Untereinheiten, unter Bildung des funktionellen 70S Ribosoms. Jede spezifische mRNA-Kette enthält eine oder mehrere Stellen, an denen die freien 30S Partikeln haften bleiben. Diese Stellen enthalten die Nukleotidsequenzen, die die ersten Aminosäuren in der Polypeptidkette codieren. Pro Polypeptidkette, die von einem bestimmten «messenger» codiert wird, gibt es höchstens einen Haftpunkt. Wenn es mehr als eine Haftstelle pro Polypeptidprodukt gäbe, würden unvollständige Polypeptide hergestellt werden. Vor kurzem wurden die ersten Teilsequenzen der Haftstellenbereiche ausgearbeitet. Ihre Isolierung wurde dadurch erreicht, daß man Ribosomen an die messenger-RNA des Phagen R17 (vergleiche Kapitel 15) binden ließ und dann das Enzym Ribonuklease zugab, das alle Sequenzen, außer denen, die durch Bindung von Ribosomen an die Initiationsstelle geschützt sind, abbaut. Die Methoden der Nukleotidsequenzenanalyse wurden sodann auf die geschützten Fragmente angewendet und lieferten die in Abbildung 12-14 gezeigten Resultate.

Diese Sequenzen sind noch immer zu fragmentarisch, um uns zu zeigen, warum die 30S Untereinheiten sich nur an bestimmte Stellen heften. Die richtige Erklärung mag mit der Tatsache zu tun haben, daß alle natürlichen



**ABBILDUNG 12-14** Bindungsstellen für Ribosomen auf den drei Genen entlang des RNA-Moleküls des Phagen R17. An diesen Stellen können sich Ribosomen anheften und die Proteinsynthese beginnt am Initiationstriplett AUG.



messenger-RNAs (zum Unterschied von künstlichen Messengern; vergleiche Kapitel 13) beträchtliche doppelhelikale Bereiche enthalten, die durch haarnadelartige Faltungen gebildet werden, die denen in tRNA und rRNA ähnlich sind. Derzeit nimmt man an, daß die Haftstellen eine oder mehrere einsträngige Regionen enthalten, vielleicht mit spezifischen Sequenzen. Wenn dies der Fall ist, muß die Sequenz der Nukleotide innerhalb jeder natürlichen mRNA so geartet sein, daß die RNA eine Konfiguration annimmt, in keine langen einsträngigen Regionen der es tatsächlich über weite Bereiche hinweg gibt.

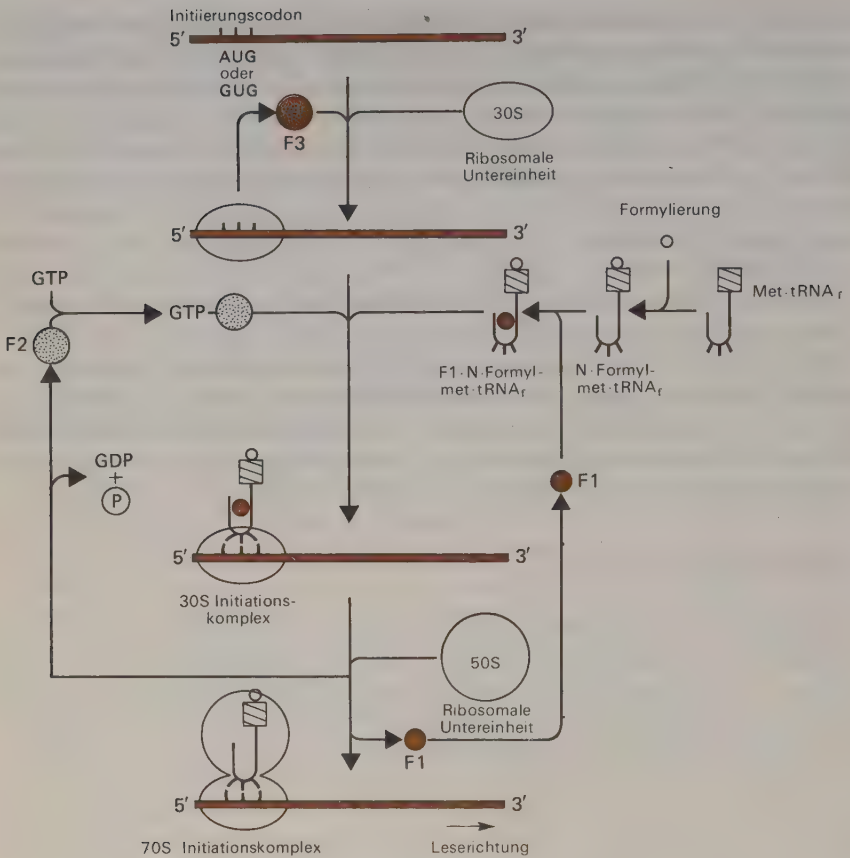
Wenn sich ein Ribosom mit einer mRNA verbindet und die Polypeptidsynthese beginnt, kommt das Ribosom in Kontakt mit Regionen der mRNA, an die es sich vor der Synthese nicht binden konnte. Auf irgendeine Art zerstört die Anwesenheit eines haftenden Ribosoms zeitweilig nahegelegene, durch Haarnadelfaltung entstandene doppelhelikale Regionen; dadurch ergeben sich einsträngige Bereiche, die sowohl Ribosomen binden als auch die richtigen AS~tRNA Vorstufen auswählen können.

### INITIIERUNGSFAKTOREN

Ein Gemisch aus N-Formyl-met-tRNA, mRNA und den 30S und 50S Untereinheiten allein genügt nicht für die Initiierung. Mindestens drei separate Proteine, die normalerweise kein Bestandteil der Ribosomen sind, sind notwendig (Abbildung 12-15). Eines dieser Proteine (F3) wird benötigt, um die 30S Partikeln an mRNA zu binden. Ein zweites Protein (F1) verknüpft sich mit f-Met-tRNA und hilft ihr, sich an den 30S-mRNA Initiationskomplex zu binden. Es wird freigesetzt, wenn die 50S. Untereinheit in den Komplex eintritt. Wie das dritte (F2) Protein genau wirkt, ist noch unklar, aber es ist bekannt, daß es GTP bindet und auch, daß es bei der Bildung des 30S Initiationskomplexes gebraucht wird.

### DIE LESERICHTUNG DER mRNA IST VON 5' NACH 3'

Nachdem sich ein mRNA-Molekül an ein Ribosom gebunden hat, muß es sich während der Proteinsynthese immer in einer bestimmten Richtung bewegen. Es hat keine Wahl, nach rechts oder links zu wandern, was wieder auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß RNA-Moleküle eine Ausrichtung haben, die durch die relativen Orientierungen der 3'- und 5'-Enden definiert ist. Das Ende, das zuerst gelesen wird —das 5'-Ende— wird auch zuerst synthetisiert. Dies eröffnet die Möglichkeit, daß sich ein Ribosom an ein unvollständiges mRNA-Molekül anheften kann, das gerade auf seiner DNA-Matrize synthetisiert wird. Wenn andererseits die Polypeptidsynthese von



F1[MG 8.000] wahrscheinlich daran beteiligt, 50S an den 30S-Initiationskomplex zu binden  
 F2[MG 75.000] wahrscheinlich daran beteiligt, N-blockierte Aminoacyl-tRNA zu binden  
 F3[MG 30.000] bindet wahrscheinlich die 30S ribosomale Untereinheit an mRNA

**ABBILDUNG 12-15** Schematische Darstellung des Initiierungsprozesses bei der Proteinsynthese. [Nur eine der zwei tRNA-Bindungsstellen auf dem Ribosom ist gezeigt. Es ist nicht bekannt, welche Stelle (A oder P) die f-Met-tRNA zuerst besetzt.]

3' nach 5' vor sich ginge, dann müßte zuerst ein Stück mRNA synthetisiert werden, dessen Länge einer vollständigen Polypeptidkette entspricht, bevor sie sich an ein Ribosom anheften könnte. Die Tatsache, daß die Proteinsynthese von 5' nach 3' abläuft, bedeutet höchstwahrscheinlich, daß es normalerweise in schnell wachsenden Zellen keine langen Teilstücke von mRNA gibt, die nicht an Ribosomen gebunden sind.

### JEDES RIBOSOM HAT ZWEI tRNA BINDUNGSSTELLEN

Jedes 70S Ribosom enthält zwei Mulden, in die tRNA-Moleküle eingefügt werden können (Abbildung 12-16). Man nennt sie die «P» (Peptidyl) und die «A» (Aminoacyl) Stellen. Jedes Loch ist teilweise durch eine 30S Region und eine 50S Region und durch ein spezifisches mRNA Codon begrenzt. Obwohl die durch Ribosomen gebildete Oberfläche jede der spezifischen AS~tRNAs aufnehmen kann, da sie sich mit einer unspezifischen Region des tRNA-Moleküls verbindet, ist die durch das Codon gebildete Oberfläche spezifisch für ein einmaliges tRNA-Molekül.

Wir wissen bis jetzt noch nicht, ob die auslösende f-Met-tRNA zuerst an die «P»-Stelle bindet, oder ob sie zuerst an die «A»-Stelle geht und dann erst zur «P»-Stelle wandert. Es ist jedoch sicher, daß sie sich in der «P»-Stelle befinden muß, bevor die zweite AS~tRNA sich spezifisch an das Ribosom binden kann. Für alle AS~tRNAs, bis auf f-Met-tRNA, weiß man sicher, daß der Eintritt in das Ribosom durch die «A»-Stelle erfolgt. Nachdem die zweite AS~tRNA richtig in der «A»-Stelle untergebracht ist, wird enzymatisch eine Peptidbindung gebildet; dadurch entsteht ein Dipeptid (zwei Aminosäuren, verbunden durch eine Peptidbindung), das durch ein tRNA-Molekül, den Adaptor der zweiten Aminosäure, abgeschlossen wird. Dieser Prozeß der Aminosäureaddition wiederholt sich dann immer wieder, wobei jedesmal eine Aminosäure hinzugefügt wird, bis zur Bildung einer vollständigen Kette (Abbildung 12-16). Bei diesen Vorgängen sollten die folgenden Schritte betont werden.

1. Das wachsende Carboxylende wird immer durch ein tRNA-Molekül abgeschlossen. Die Bindung dieser abschließenden tRNA an entweder die «P»- oder die «A»-Bindungsstelle ist die Hauptkraft, die eine wachsende Polypeptidkette an das Ribosom bindet.

2. Die Bildung der Peptidbindung bewegt den Haftpunkt der wachsenden Kette von der «P»- zu der «A»-Bindungsstelle.

3. Bald nach oder sogar gleichzeitig mit der Bildung der Peptidbindung wird das freigesetzte tRNA-Molekül aus seiner «P»-Bindungsstelle ausgestoßen.

4. Das neue abschließende tRNA-Molekül bewegt sich dann (transloziert) von der «A»- zu der «P»-Bindungsstelle. Gleichzeitig bewegt sich die mRNA-Matrize, die an die kleinere Ribosomenuntereinheit gebunden ist, und bringt so das Codon  $n+1$  an die Position, die vorher von dem Codon  $n$  eingenommen wurde.

5. Die jetzt vakante «A»-Stelle wird in die Lage versetzt, ein neues AS~tRNA-Molekül aufnehmen zu können, dessen Spezifität durch die richtige Basenpaarung zwischen seinem Anticodon und dem entsprechenden mRNA Codon bestimmt wird.

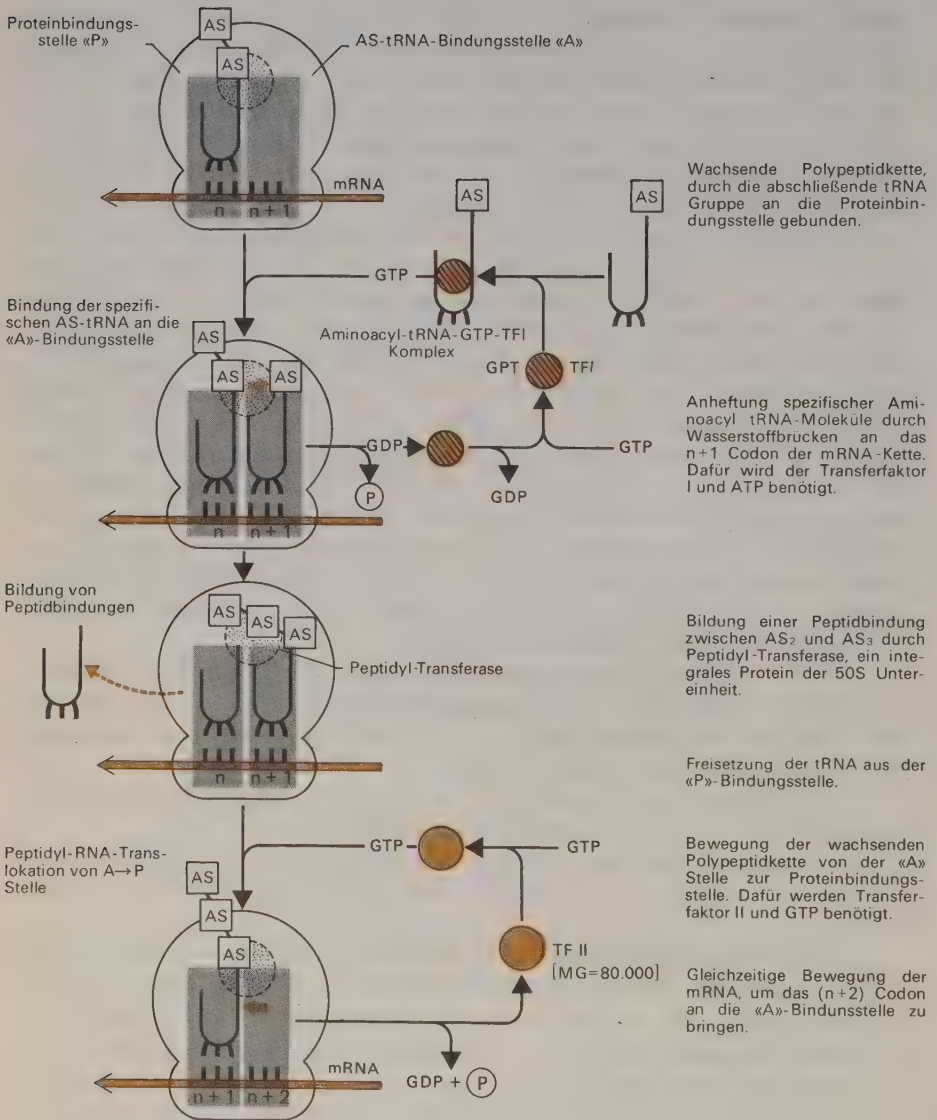


ABBILDUNG 12-16 Schematische Darstellung der Bildung von Peptidbindungen, die die Rolle der Transferfaktoren zeigt.



## DIE EXISTENZ VON TRANSFERFAKTOREN

Da die Aminosäure-Carboxylgruppen durch die Verbindung mit ihren tRNA Adaptoren aktiviert werden, dachte man ursprünglich, daß vielleicht nur ein einziges spezifisches Enzym für die Ausbildung der Peptidbindung benötigt würde. Außerdem gab es keinen Grund für die Annahme, daß für die Polymerisationsreaktion zusätzliche Energie benötigt würde. Beide Vorstellungen waren jedoch falsch. Erstens wird das energiereiche Molekül GTP (analog zu ATP, wobei Adenin durch Guanin ersetzt ist) für die Synthese aller Peptidbindungen in Proteinen benötigt. Zweitens wurden zwei Proteine (die Transferfaktoren) isoliert, die normalerweise kein Bestandteil der Ribosomen sind, die aber ebenfalls nötig sind. Außerdem beschleunigt keines dieser zwei Proteine selbst die tatsächliche Bildung der Peptidbindungen.

## BINDUNG DER AS~tRNA AN DIE «A»-BINDUNGSSTELLE ERFORDERT DEN TRANSFERFAKTOR I

Ursprünglich glaubte man, daß die Anheftung der AS~tRNA Vorstufen an die Ribosomen ein nicht-enzymatischer Vorgang wäre, der stattfindet, wenn die richtige AS~tRNA zufällig mit der «A»-Bindungsstelle und ihrem spezifisch bindenden mRNA Codon zusammenstößt. Kürzlich ausgeführte Experimente zeigen jedoch, daß die Bindungsreaktion bei weitem nicht so einfach ist. Sie beginnt, wenn einer der Transferfaktoren (TF I) mit GTP und AS~tRNA reagiert und einen AS~tRNA-GTP-TFI-Komplex bildet. Dieser Komplex transferiert dann seine AS~tRNA Komponente auf die «A»-Bindungsstelle, wobei ein freier TF I - GDP Komplex und  $\text{P}_i$  freigesetzt werden. Jeder Bindungsschritt benötigt also die Spaltung einer der energiereichen GTP-Bindungen. Auf welche Weise diese Energie die Bindung erleichtert, ist noch nicht bekannt.

## DAS ENZYM, DAS DIE PEPTIDBINDUNG BILDET, IST EIN INTEGRALER BESTANDTEIL DER 50S-PARTIKEL

Die enzymatische Katalyse der Knüpfung der Peptidbindung selbst wird durch eins der Proteine der größeren ribosomalen Untereinheit bewirkt. Es wird Peptidyl-Transferase genannt und man nimmt an, daß je ein Exemplar pro 50S Untereinheit vorhanden ist. Alle bisherigen Versuche, dieses Enzym von den 50S Partikeln zu trennen, sind fehlgeschlagen. Sobald die vollständige Rekonstitution einer 50S Partikel gelungen ist, sollte es möglich sein, ein spezifisches 50S Protein als den aktiven Katalysator zu identifizieren.

## TRANSLOKATION DER PEPTIDYL-tRNA ERFORDERT DEN TRANSFERFAKTOR II

Man nimmt an, daß die Bewegung der Peptidyl-tRNA von der «A»- zu der «P»-Bindungsstelle durch den Transferfaktor II (TF II), der oft auch Translokase genannt wird, verursacht wird. Bei diesem Prozeß bildet sich zuerst ein Komplex aus TFII-GTP-Ribosom. Die Translokation findet dann unter Hydrolyse von GTP zu GDP und  $P_i$  statt; darauf folgt die Freisetzung des freien, wieder verwendbaren TF II. Die Spaltung der energiereichen Bindung ist für die Bewegung unbedingt notwendig und genaue Untersuchungen zeigen, daß für jeden Translokationsschritt ein GTP gespalten wird. Es muß noch geklärt werden, ob die Translokation zeitlich mit der schrittweisen Bewegung der drei mRNA-Nukleotide über die Oberfläche des Ribosoms gekoppelt ist. Gegenwärtig haben wir keine Ahnung, wie die relative Bewegung der mRNA-Ketten über die Ribosomen hinweg stattfindet. Man muß zweifellos weitere Kenntnis der 3D-Struktur des Ribosoms abwarten, bevor man ein genaues Modell formulieren kann.

## INHIBITION SPEZIFISCHER SCHRITTE BEI DER PROTEINSYNTHESE DURCH ANTIBIOTIKA

Eine Anzahl von Antibiotika erwies sich als sehr nützlich bei der Aufklärung der Schritte, über die Proteine aufgebaut werden. Zum Beispiel wirkt Puromycin, ein sehr wirkungsvoller Hemmfaktor für das Wachstum aller Zellen, indem es die Kettenverlängerung unterbricht. Seine Struktur (Abbildung 12-17) ist dem 3'-Ende eines beladenen tRNA-Moleküls sehr ähnlich; es ist daher fähig, mit großer Wirksamkeit in die «A»-Bindungsstelle des Ribosoms einzutreten und den normalen Eintritt von AS~tRNA-Vorläufern kompetitiv zu hemmen. Noch wichtiger ist, daß die Peptidyl-Transferase es als Ersatz-Substrat verwendet und dabei entstehende Ketten auf die Puromycinakzeptorstellen transferiert. Da sich die Puromycinreste nur schwach mit der «A»-Bindungsstelle verbinden, fallen die durch Puromycin abgeschlossenen entstehenden Ketten von den Ribosomen ab, wobei unvollständige Ketten verschiedener Länge entstehen.

Ein anderes nützliches Antibiotikum ist Fusidinsäure, die die Translokationsfunktion des Transferfaktors II spezifisch hemmt. Die Peptidyl-Transferasereaktion selbst wird durch die Antibiotika Sparsomycin und Lincomycin gehemmt, die sich beide spezifisch an die 50S Untereinheit binden. Im Gegensatz dazu ist Streptomycin, das sich mit der 30S Untereinheit verbindet, ein starker Hemmfaktor der Ketteninitiation.

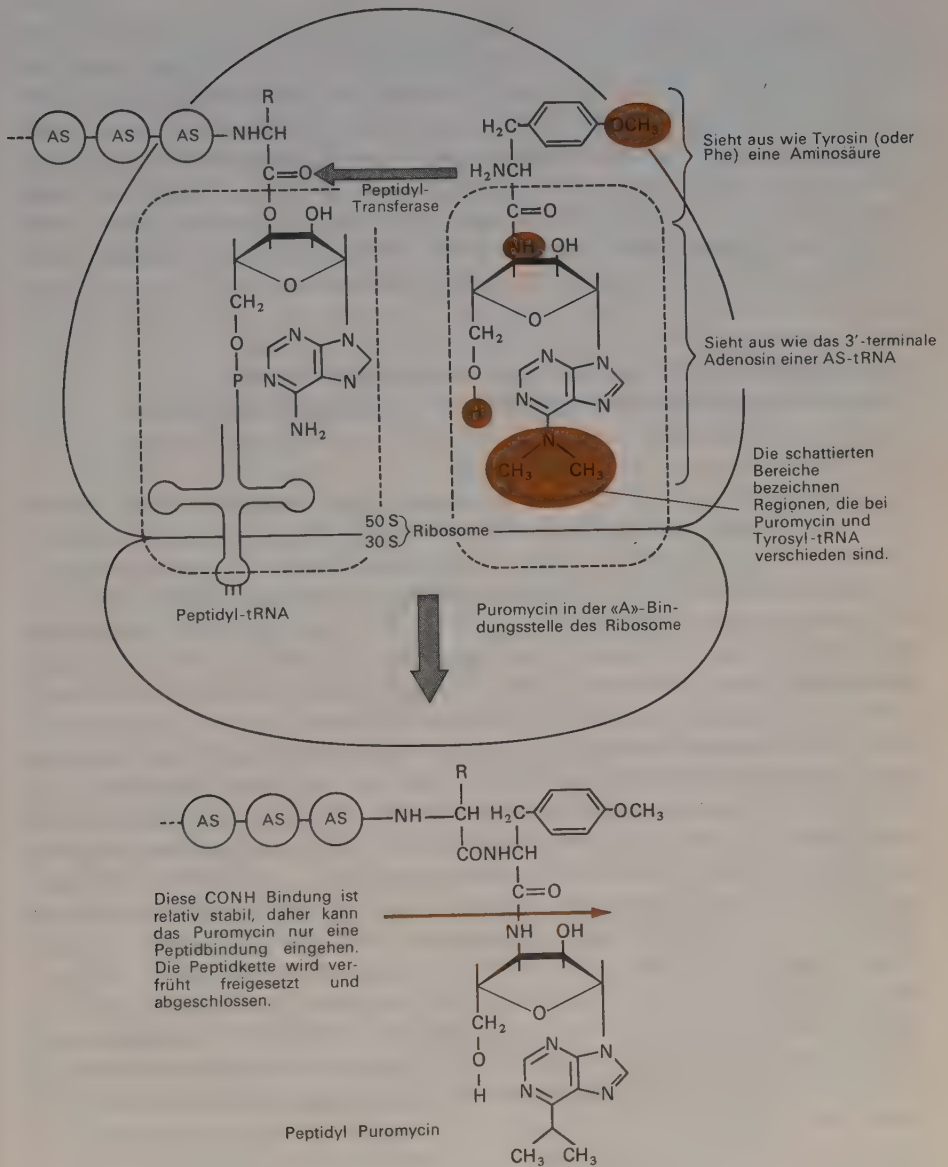


ABBILDUNG 12-17 Vorzeitige Beendigung der Peptidkette durch Puromycin.

## **POLYPEPTIDKETTEN FALTEN SICH SCHON WÄHREND DER SYNTHESE**

Unter optimalen Bedingungen beträgt die Zeit, die für die Synthese einer *E. coli* Polypeptidkette mit 300 bis 400 Aminosäuren benötigt wird, 10 bis 20 Sekunden. Während dieser Zeit bleibt die sich verlängernde Kette nicht ein willkürliches Knäuel, sondern nimmt durch die Bildung vieler ihrer sekundärer Wechselwirkungen rasch einen Großteil ihrer endgültigen 3D-Gestalt an. So nehmen viele Proteine fast gänzlich ihre endgültige Gestalt an, bevor noch die letzten Aminosäuren angefügt werden. Als Folge davon findet man Spuren vieler enzymatischer Aktivitäten auf Ribosomen, die ihre Polypeptidprodukte noch nicht freigesetzt haben.

## **DIE KETTENFREISETZUNG HÄNGT VON SPEZIFISCHEN FREISETZUNGSFAKTOREN AB, DIE KETTENABSCHLIESSENDE CODONS BENÖTIGEN**

Zwei Bedingungen sind für den Kettenabschluß notwendig. Eine ist die Anwesenheit eines Codons, das spezifisch anzeigt, daß die Kettenverlängerung aufhören soll. Die andere ist die Anwesenheit eines Freisetzungsfaktors, (release factor), der das Kettenabschlußsignal erkennt. Diese komplexen Vorgänge sind deshalb notwendig, weil das Carboxylende einer Polypeptidkette noch immer mit seinem tRNA-Adaptor verbunden ist, wenn die Kette ihre volle Länge erreicht hat. Der Kettenabbruch, die Termination, muß also die Abspaltung der abschließenden tRNA mit sich bringen. Dabei trennt sich die entstehende Kette schnell, da ihre Bindung an das Ribosom hauptsächlich über ihren tRNA Bestandteil erfolgt. Die Aufklärung des genetischen Codes (vergleiche Kapitel 13) zeigte, daß drei Codons den Schlußpunkt spezifisch anzeigen. Ihre Existenz führte anfangs zu der Erwartung von kettenabschließenden tRNA-Molekülen; das heißt, einer tRNA, die sich spezifisch mit dem Stoppcodon verbinden würde, aber die keine mit ihrem 3'-Adenosin verbundene Aminosäure hätte und auf irgendeine Art die Freisetzung der abschließenden tRNA Gruppe fördern würde. Neuere Versuche schließen jedoch die Existenz solcher Moleküle eindeutig aus. Statt dessen werden die Stoppcodons von spezifischen Proteinen («Release»- oder Freisetzungsfaktoren) erkannt. Es muß noch geklärt werden, ob die Releasefaktoren Enzyme sind und direkt die Abspaltung der abschließenden tRNA Reste katalysieren.

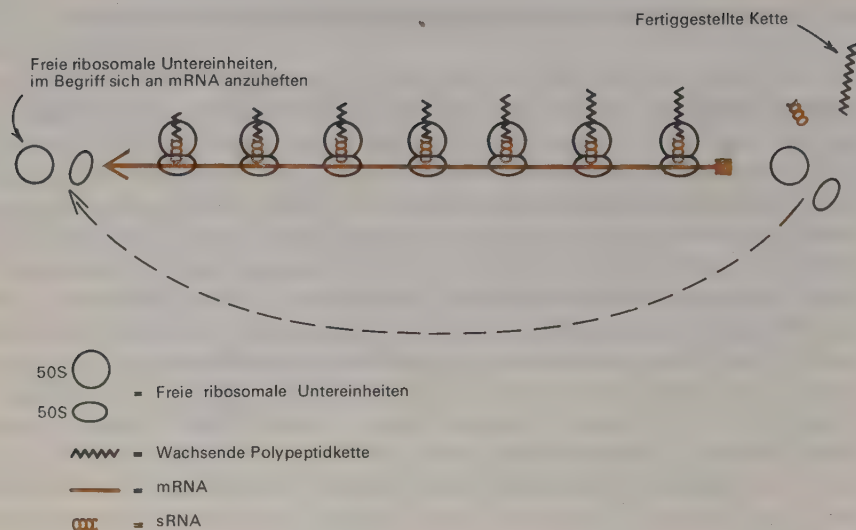


## SPALTUNG IN POLYPEPTIDKETTEN NACH KETTENABSCHLUSS

Es sind viele Beispiele bekannt, bei denen spezifische Enzyme nach der Synthese modifiziert werden. Die Entfernung von Formyl- und Methioningruppen aus vielen bakteriellen Proteinen wurde bereits früher erwähnt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß bald Fälle gefunden werden, wo durch die Wirkung von Exopeptidasen (Enzymen, die endständige Aminosäuren der Reihe nach entfernen) mehr als eine Aminosäure entweder vom Amino- oder vom Carboxylende entfernt wird. Ebenso wichtig sind die Endopeptidasen, die interne Peptidbindungen spalten. Insulin, von dem man viele Jahre hindurch annahm, daß es durch die Aggregation unabhängig synthetisierter A- und B-Ketten aufgebaut würde, wird zuerst als eine einzelne Kette (Proinsulin) synthetisiert, deren 3D-Gestalt durch Bildung verschiedener Disulfid (S—S)-Bindungen zustande kommt. In der Folge entfernen zwei interne Schnitte 33 Aminosäuren und die früher benachbarten Polypeptidfragmente werden nur durch die S—S Bindungen zusammengehalten. Es ist somit ganz klar, daß die Kenntnis der Aminosäuresequenz eines gereinigten Enzyms nicht notwendigerweise die echten initierenden und abschließenden Aminosäuren offenbaren muß.

## EIN mRNA-MOLEKÜL ARBEITET GLEICHZEITIG AN MEHREREN RIBOSOMEN

Der Abschnitt eines mRNA-Moleküls, der mit einem einzigen Ribosom in Kontakt ist, ist relativ kurz. Das erlaubt einem bestimmten mRNA-Molekül, gleichzeitig an verschiedenen Ribosomen zu arbeiten. Einzelne mRNA-Moleküle können gleichzeitig über die Oberflächen mehrerer Ribosomen wandern (die Ansammlung von Ribosomen, die an eine einzige mRNA-Kette gebunden sind, wird ein Polyribosom genannt) und dienen so zur gleichen Zeit als Matrice für mehrere Polypeptidketten. Zu einem bestimmten Zeitpunkt variieren die Kettenlängen auf den aufeinanderfolgenden Ribosomen in dem Polyribosom in direkter Proportion zu dem Bruchteil des Messengerstranges, dem jedes Ribosom schon ausgesetzt wurde (Abbildung 12-18). Das bedeutet, daß zu jedem gegebenen Zeitpunkt die Polypeptidketten, die entlang der mRNA hergestellt werden, an der Vorderseite des Stranges am kürzesten sind und schrittweise gegen das Ende zu immer länger werden. Die Größe der Polyribosomen variiert stark, da sie von der Größe der mRNA-Kette abhängt. Bei maximaler Ausnützung einer mRNA-Kette findet man ein Ribosom pro 80 mRNA Nukleotide. So enthalten die Polyribosomen, die Hämoglobinmoleküle ergeben, für gewöhnlich 4 bis 6 Ribosomen (Abbildung 12-19), während ungefähr 12 bis 20 Ribosomen mit den



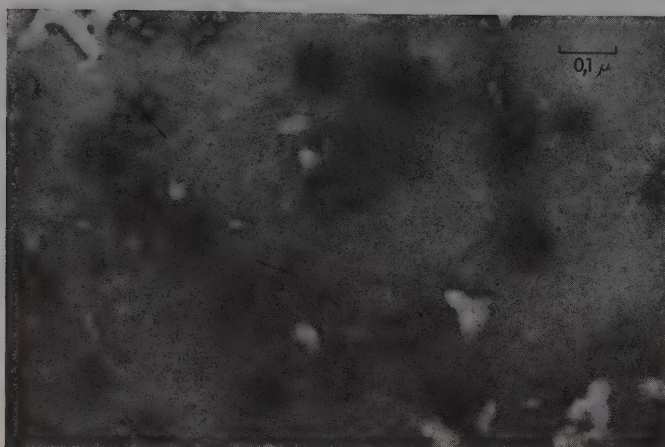
**ABBILDUNG 12-18** Schema eines Polyribosoms während der Proteinsynthese. Das mRNA-Molekül bewegt sich von rechts nach links.

mRNA-Molekülen verbunden sind, an welchen Proteine im Bereich von MG 30.000 bis 50.000 (300 bis 500 Aminosäuren) synthetisiert werden.

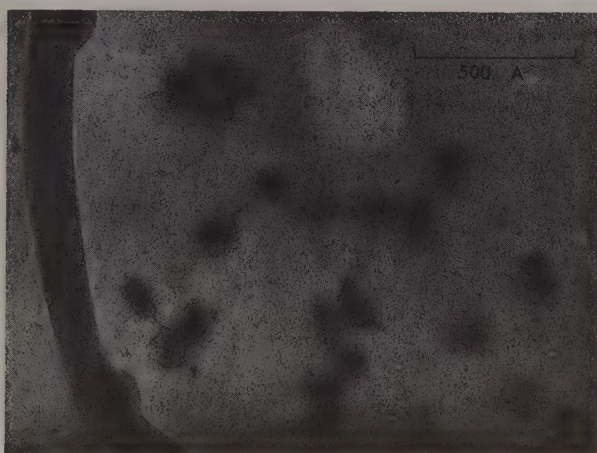
Die Fähigkeit einer einzigen mRNA, an mehreren Ribosomen gleichzeitig zu arbeiten erklärt, warum eine Zelle verhältnismäßig so wenig mRNA braucht. Vor der Entdeckung von Polyribosomen und als man dachte, daß nur ein Ribosom mit einem bestimmten mRNA-Molekül verbunden wäre, schien die Tatsache, daß die mRNA nur 1 bis 2 Prozent der gesamten zellulären RNA ausmachte, höchst paradox. Das ergab sich aus der Tatsache, daß, wenn die durchschnittliche mRNA-Kette ein MG von ungefähr  $5 \times 10^5$  hätte, in einem bestimmten Augenblick höchstens 10 Prozent der Ribosomen einer Zelle Protein herstellen könnten.

## ÜBER DIE RIBOSOMEN BLEIBT NOCH SEHR VIEL ZU LERNEN

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Grundlagen der Proteinsynthese in groben Zügen derzeit bekannt sind. Jedes der grundlegenden Charakteristika, die in Abbildung 12 - 20 gezeigt werden, ist durch viele verschiedene Experimente belegt. Nichtsdestoweniger muß man noch sehr viel neue Information erhalten, bevor man ehrlich sagen kann, daß die Proteinsynthese auf molekularer Ebene verstanden wird. Das zentrale Problem ist die Rolle des Ribo-



(a)



(b)

**ABBILDUNG 12-19** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Polyribosomen aus Kaninchenretikulozyten. (a) Zeigt, daß viele der beobachteten Polyribosomen 4-6 Ribosomen enthalten. Die kleineren Gruppen sind höchstwahrscheinlich Abbauprodukte, die während ihrer Isolierung aus den Zellen entstanden sind. Die Pfeile zeigen Material, das zwei Ribosomen zu verbinden scheint. (b) Bei stärkerer Vergrößerung ist das Vorhandensein eines verbindenden dünnen mRNA-Stranges deutlich sichtbar. [Aufnahmen von H. S. Slayter; wiedergegeben nach H. S. Slayter et al., J. Mol. Biol., 7, 652 (1963), mit Genehmigung.]

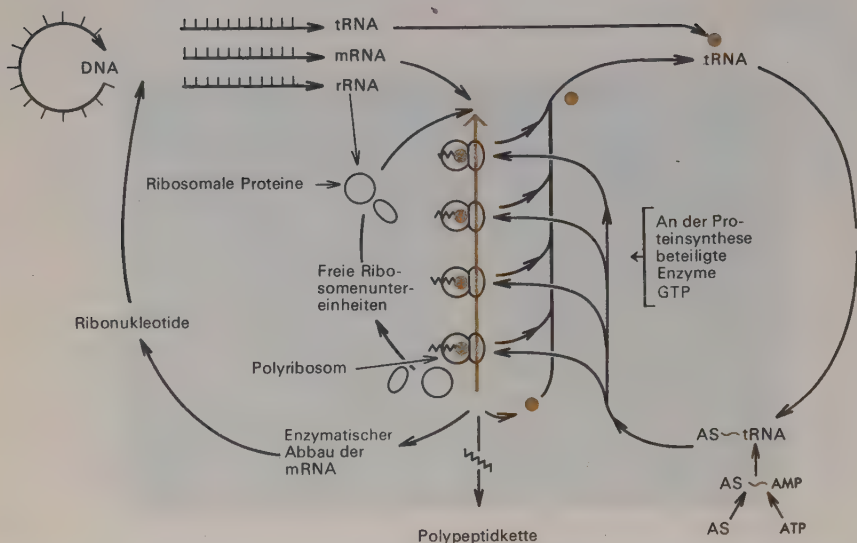
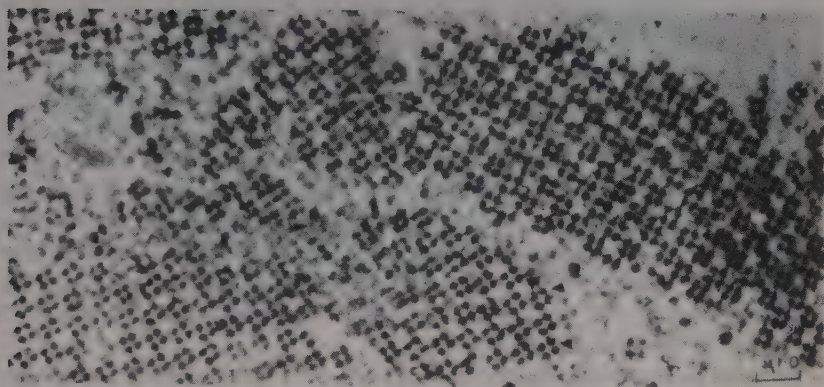


ABBILDUNG 12-20 Schematische Darstellung der Rolle der RNA bei der Proteinsynthese.

soms. Obwohl einige physikalische Parameter, wie Molekulargewicht und RNA Gehalt genau bestimmt wurden, weiß man fast gar nichts über die genaueren Strukturen der rRNA oder der Ribosomenproteine, oder wie sie sich mit tRNA oder mRNA verbinden. Neure spektakuläre methodische Fortschritte bei der Bestimmung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen könnten innerhalb des nächsten Jahrzehnts einen erfolgreichen Angriff auf die Sequenzen sowohl der 16S als auch der 23S rRNA-Ketten erlauben, ebenso wie auf die der meisten Ribosomenproteine. Aber sogar diese Daten werden wahrscheinlich wenig nützliche Information über ihre räumliche Anordnung liefern. Obwohl Forschungen mit einem hochauflösenden Elektronenmikroskop uns vielleicht bald Daten über die Anordnung der «P»- und «A»-tRNA-Bindungsstellen liefern könnten, können sie auf atomarer Ebene keine Details zeigen. Diese wird man erst erhalten, wenn es möglich sein wird, Röntgenbeugungsanalysen anzuwenden. Viele Jahre hindurch schien dieser Weg fast hoffnungslos, da es niemandem gelungen war, Ribosomenkristalle zu züchten und Zweifel bestanden, ob das möglich sein würde.

In letzter Zeit jedoch wurden zahlreiche Beispiele gefunden, bei denen sich Ribosomenkristalle innerhalb lebender Zellen bilden. Die Zellen, in denen das vorkommt, sind jene, in denen die Proteinsynthese zeitweilig aufgehört hat. Zum Beispiel werden ausgezeichnete Kristalle (Abbildung





**ABBILDUNG 12-21** *Ribosomenkristalle in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Dünnschnittes durch eine Hühnerembryozelle, die 6 Std. bei 5°C gekühlt wurde. [Von Byers, J. Mol. Biol., 26, 155 (1967). Die Aufnahme wurde freundlicherweise von B. Byers, Biologische Laboratorien, Harvard University, zur Verfügung gestellt.]*

12-21) in Hühnerembryozellen gefunden, wenn man die Inkubation bei hohen Temperaturen unterbricht und die Zellen langsam abkühlen läßt. Unter diesen Bedingungen werden entstehende Ketten beendet, aber es findet keine neue Initiierung statt und die mRNA trennt sich von den einzelnen Ribosomen. Die resultierenden freien Ribosomen können dann spontan aggregieren. Die Existenz dieser *in vivo* Kristallisation läßt hoffen, daß in nicht zu ferner Zukunft Kristalle im Labor gezüchtet werden können. Das jedoch wird nur der erste Schritt in einem gigantischen Unternehmen sein, da bis jetzt noch nie röntgenstrukturanalytische Methoden für die Aufklärung von Strukturen verwendet wurden, die in ihrer Komplexität dieser auch nur annähernd gleichkamen. Wir müssen uns also auf eine lange Wartezeit und viel schwere Arbeit gefaßt machen, bevor wir verstehen werden, warum eine so komplizierte Struktur für die Proteinsynthese notwendig ist.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Aminosäuren verbinden sich nicht direkt mit RNA-Matrizen. Sie verbinden sich zuerst mit spezifischen Adaptormolekülen unter Bildung von AS~Adaptorkomplexen. Die Adaptorkomponente hat eine starke chemische Affinität für RNA Nukleotide. Alle Adaptoren sind Transfer-RNA-Moleküle (tRNA) von MG~25.000. Ein bestimmtes tRNA-Molekül ist spezifisch für eine bestimmte Aminosäure.*

Alle tRNA-Ketten falten sich zu einem Kleeblattmuster, dessen Stengel Wasserstoffbrücken gebundene Basenpaare enthalten und dessen Schlingen einige ungepaarte Basen enthalten. Eine der Schlingen enthält das Anticodon, die Gruppe von 3 Basen, die mit drei aufeinanderfolgenden Matrizenbasen («Codon») Basenpaarung eingehen. Aminosäuren verbinden sich über ihre Carboxylgruppen mit dem 3'-terminalen Adenosin der tRNA-Moleküle durch energiereiche kovalente Bindungen. Adaptierte Aminosäuren werden so «aktiviert». Für jede Aminosäure gibt es ein spezifisches aktivierendes Enzym (Aminoacylsynthetase); somit ist es ein Enzym, nicht tRNA, das die Aminosäure erkennt. Die allgemeine Genauigkeit der Proteinsynthese kann daher nicht größer sein als die Genauigkeit, mit der die aktivierenden Enzyme die verschiedenen Aminosäuren selektiv erkennen können.

Nach der Aktivierung diffundieren die AS~tRNA-Moleküle zu den Ribosomen, die kugelförmige Partikeln sind, an denen sich die Peptidbindungen bilden. Ribosomen haben Molekulargewichte von ungefähr  $3 \times 10^6$  und bestehen ungefähr zur Hälfte aus Protein und rRNA. Sie sind immer aus einer großen ( $MG \sim 2 \times 10^6$ ) und einer kleinen ( $MG \sim 10^6$ ) Untereinheit aufgebaut. Zusätzlich zu größeren RNA-Ketten (16S und 23S RNA) werden ungefähr 60 verschiedene Proteine in einem einzigen Ribosom gefunden. rRNA enthält keine genetische Information und ihre Funktion ist noch immer ein großes Geheimnis. Die Matrize selbst stellt eine dritte Form der RNA dar, messenger RNA (mRNA - deutsch: Bote). Messenger-RNA lagert sich an Ribosomen an und bewegt sich über sie hinweg, um aufeinanderfolgende Codons in die Lage zu versetzen, die richtigen AS~tRNA-Vorstufen auszuwählen.

Proteinketten wachsen schrittweise, beginnend am aminoterminalen Ende. Das bedeutet, daß das wachsende Ende immer durch ein tRNA-Molekül abgeschlossen wird. Die Bindung der entstehenden Kette an das Ribosom erfolgt durch die Bindung der abschließenden tRNA Gruppe der Kette an eine Mulde in der Oberfläche des Ribosoms. Jedes Ribosom hat zwei Mulden, die «P»-(Peptidyl) und die «A» (Aminoacyl)-Mulde. AS~tRNA-Moleküle gehen normalerweise zuerst an die «A»-Stelle, was die darauffolgende Bildung einer Peptidbindung mit der wachsenden Kette zuläßt, die an der «P»-Bindungsstelle festgehalten wird. Dadurch wird die entstehende Kette auf die «A»-Bindungsstelle transferiert. Die Wirkung des Enzyms Translokase rückt dann die entstehende Kette zurück an die «P»-Bindungsstelle, wo ein neuer Zyklus beginnen kann. Sowohl die Anheftung der AS~tRNA an die «A»-Bindungsstelle als auch der Translokationsprozeß erfordern die Spaltung von GTP zu GDP und  $P_i$ . Die Bewegung der aufeinanderfolgenden Codons über die Oberfläche des Ribosoms könnte gleichzeitig mit dem Translokationsschritt stattfinden, aber man weiß nichts darüber, wie sich dieser Vorgang abspielt. Die Initiierung der Synthese erfordert separate Enzyme zusätzlich zu denen, die an der Kettenverlängerung beteiligt sind. Bei bakteriellen Ribosomen ist an der Initiierung

immer N-Formyl-methionin-tRNA beteiligt. Der Kettenabschluß kommt durch das Erkennen eines spezifischen Stoppsignals durch spezifische Proteine (die Freisetzungs- oder Release-Faktoren) zustande.

Der Fertigstellung der Kettensynthese folgt die Aufspaltung der Ribosomen in große und kleine ribosomale Untereinheiten. Die Wiedervereinigung von Untereinheiten findet erst statt, nachdem sich die initiiierende Aminosäure mit einem Komplex aus mRNA und kleiner Untereinheit verbunden hat. Ein bestimmtes mRNA-Molekül arbeitet gewöhnlich gleichzeitig an mehreren Ribosomen (ein Polyribosom). So sind zu einem gegebenen Zeitpunkt viele Codons derselben Matrize «an der Arbeit».

## LITERATUR

- Crick, F. H. C., «On Protein Synthesis». *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, **12**, 138-163 (1958). Eine Darstellung der Gedanken, die den Autor dazu führten, die Adaptorhypothese vorzuschlagen.
- Watson, J. D., «The Involvement of RNA in the Synthesis of Proteins», *Science*, **140**, 17-26 (1963). Historischer Überblick über Arbeiten zwischen 1953 und 1962, die etablieren, wie RNA an der Proteinsynthese beteiligt ist.
- Holley, R. W., «The Nucleotide Sequence of a Nucleic Acid», Eine Beschreibung, wie der Autor die Struktur der Alanyl-tRNA ausarbeitete. Ein Artikel des *Scientific American* 1966, nachgedruckt in *The Molecular Basis of Life*, R. H. Haynes und P. C. Hanawalt (Eds.), Freeman, San Francisco, 1968.
- Levitt, M., «Detailed Molecular Model for Transfer Ribonucleic Acid», *Nature*, **224**, 759 (1969). Bis jetzt der intelligenteste Versuch, eine 3D-Gestalt für tRNA zu formulieren.
- «Mechanism of Protein Synthesis», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, (1969). Eine äußerst verständliche und auf den letzten Stand gebrachte Sammlung der Daten darüber, wie die Polypeptidketten zusammengesetzt werden.
- Nomura, M., «Ribosomes», *Scientific American*, Dezember 1969. Eine sehr gute einführende Übersicht, wie Ribosomen auseinander genommen und dann wieder zusammengesetzt werden können.
- Spirin, A. S. und L. P. Gavrilova, *The Ribosome*, Springer, Berlin 1969. Eine sehr vollständige und informative Zusammenfassung der Struktur von Ribosomen und wie sie während der Proteinsynthese funktionieren.
- Steitz, J. Argetsinger, «Polypeptide Chain Initiation: Nucleotide Sequences of the Three Ribosomal Binding Sites in Bacteriophage R17 RNA», *Nature*, **224**, 957 (1969). Ein erster Blick auf die Nukleotidsequenzen am Beginn von Genen.
- Anfinsen, C. B. (Ed.), *Aspects of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York, 1970. Eine Sammlung von Übersichtsartikeln.

# 13

## DER GENETISCHE CODE

Sogar als man bereits in großen Zügen wußte, auf welche Weise RNA sich an der Proteinsynthese beteiligt (1960), war die Hoffnung, bald Details über den genetischen Code selbst zu wissen, sehr gering. Zu dieser Zeit glaubte man, daß die Identifizierung der Codons für eine bestimmte Aminosäure die genaue Kenntnis sowohl der Nukleotidsequenzen eines Gens als auch die entsprechende Aminosäureanordnung in seinem Proteinprodukt voraussetzen würde. Wie schon früher erwähnt, war die Aufklärung der Aminosäuresequenzen zwar ein beschwerliches, jedoch durchaus erreichbares Ziel. Andererseits aber waren die damals geläufigen Methoden zur Bestimmung der DNA Sequenzen sehr primitiv und sogar heute gibt es noch keine detaillierten Kenntnisse über die Basensequenzen der DNA. Zum Glück erwies sich das nur als ein scheinbares und kein echtes Hindernis. 1961, nur ein Jahr nach der Entdeckung der mRNA, führte die Verwendung künstlicher Messenger-RNAs zur teilweisen Entzifferung des genetischen Codes, indem das Codon für die Aminosäure Phenylalanin eindeutig nachgewiesen wurde. Um zu erklären, wie diese Entdeckung gemacht wurde, müssen wir zuerst einige Details beschreiben, wie Biochemiker die Proteinsynthese in zellfreien Systemen untersuchen.

### DIE BEIGABE VON mRNA STIMULIERT DIE IN VITRO PROTEINSYNTHESE

Die Notwendigkeit von drei RNA Arten (tRNA, rRNA, mRNA) für die



Proteinsynthese wurde hauptsächlich durch Versuche demonstriert, in welchen man zellfreie Extrakte aus Zellen verwendete, die aktiv Protein synthetisierten. In diesen Versuchen wurden vorsichtig aufgebrochene Zellen fraktioniert, um zu sehen, welche Zellbestandteile für den Einbau von Aminosäuren in Proteine notwendig wären. Alle diese Versuche verwendeten radioaktiv markierte ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  oder  $^{35}\text{S}$ ) Aminosäuren, da die *in vitro* Proteinsynthese noch immer sehr wenig effizient ist; das bedeutet, daß man keine Nettosynthese beobachten kann. Nur durch die Verwendung markierter Vorstufen kann der Einbau von Vorstufen in Proteine eindeutig gezeigt werden (Abbildung 13-1).

Ein typischer Zeitverlauf der *in vitro* Inkorporation von radioaktiven Aminosäuren in Proteine wird durch die Kurve in Abbildung 13-2 dargestellt. Sie zeigt, daß die Synthese in einem *E. coli* Extrakt einige Minuten linear verläuft und dann langsam aufhört. Während dieser Zeitspanne geht gleichzeitig, aufgrund der Wirkung abbauender Enzyme im Extrakt mRNA verloren. Das weist darauf hin, daß der hauptsächlichste Grund für die schlechten Ausbeuten bei der zellfreien Proteinsynthese der Verlust der Matrizenkomponente ist. Die Richtigkeit dieser Annahme wird bewiesen, indem man neue mRNA zu Extrakten hinzugibt, die gerade aufgehört haben, Protein zu synthetisieren. Dieser Zusatz verursacht eine sofortige Wiederaufnahme der Synthese. Extrakte ohne mRNA sind für die Überprüfung der Aktivität der mRNA sehr wertvoll. Da sie sehr wenig funktionelle mRNA enthalten, können sie verwendet werden, um geringe Mengen an Matrizenaktivität in mRNA, die von außen zugefügt wird, festzustellen.

### VIRUS RNA IST mRNA

In Kapitel 15 werden wir zeigen, daß die genetische Komponente vieler Viren einsträngige RNA ist. Wenn diese Viren eine Zelle infizieren, muß ihr infizierendes RNA-Molekül zuerst als Matrice für die Synthese der spezifischen Proteine wirken, die benötigt werden, um den Vermehrungszyklus des Virus zu initiieren. Zu diesen notwendigen Proteinen gehört das RNA-replizierende Enzym RNA-Synthetase. Es ist daher für das infizierende, einsträngige Molekül unmöglich, für seinen komplementären Strang als Matrice zu dienen, bevor es nicht *zuerst* als Matrice für irgendeine Proteinsynthese gewirkt hat. Das bedeutet, daß die infizierende Virus-RNA fähig sein muß, sich an die Ribosomen des Wirts zu heften und die Synthese von Virus-spezifischen Proteinen zu steuern (d.h., daß sie als mRNA wirken muß). Diese Frage ist mit zellfreien Systemen sehr klar zu beweisen. Zum Beispiel stimuliert die Beigabe von TMV-RNA zu einem *E. coli* Extrakt ohne mRNA sofort die Inkorporation von Aminosäuren in Proteine.

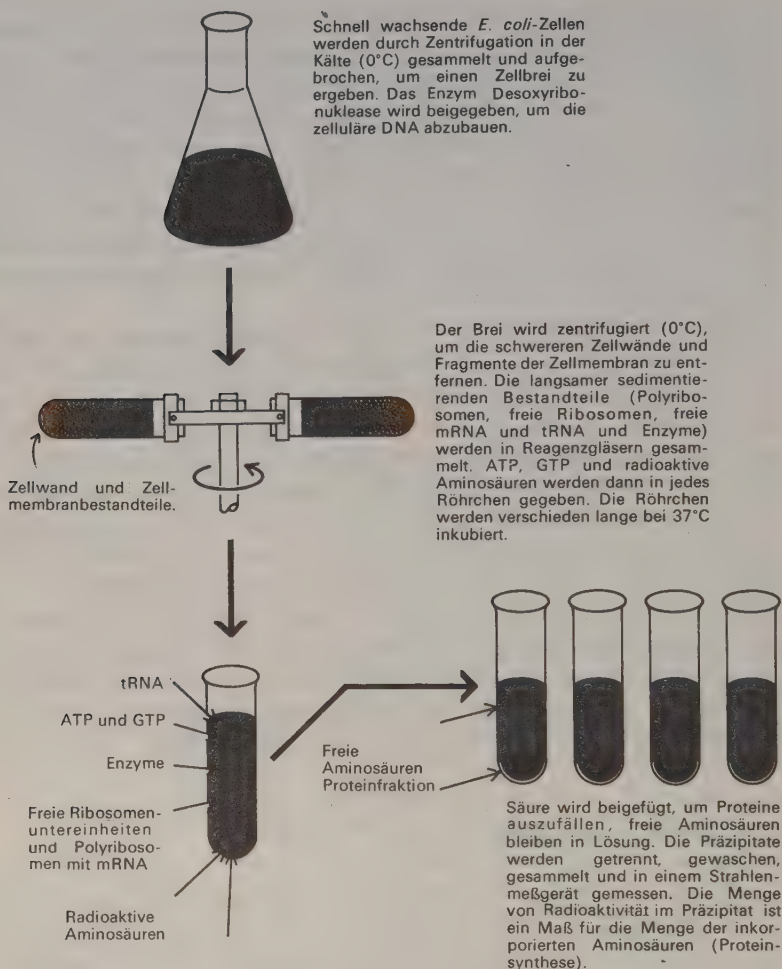
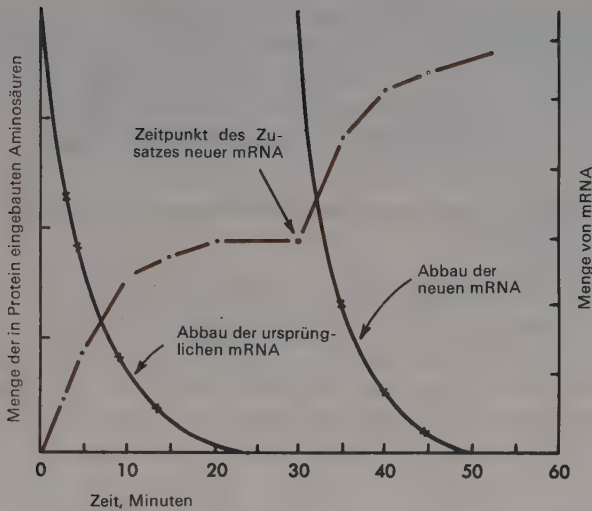


ABBILDUNG 13-1 Experimentelle Details über *in vitro* Untersuchungen der Proteinsynthese.

## SPEZIFISCHE PROTEINE KÖNNEN IN ZELLFREIEN SYSTEMEN SYNTHETISIERT WERDEN

Sogar nach Zusatz von überschüssiger mRNA sehen wir in unseren *in vitro* Systemen nur eine geringe Menge von Inkorporation von Aminosäuren in Polypeptidketten. Das bedeutet, daß wir die Bedingungen noch nicht kennen, die die normale *in vivo* Synthese gestatten. Anfänglich erhoben sich Zweifel,



**ABBILDUNG 13-2** Wirkung des Zusatzes von mRNA auf den *in vitro* Einbau von Aminosäuren in Protein durch einen *E. coli* Zellextrakt (37°C).

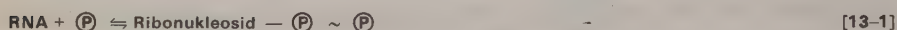
ob die neu hergestellten Proteine tatsächlich Strukturen hätten, die denen der natürlichen Proteine auch nur entfernt ähnlich sind. Zum Glück zeigte die Verwendung spezifischer Virus-RNA, daß diese Zweifel unbegründet waren und daß der genetische Code in zellfreien Systemen genau gelesen werden kann. In den ersten erfolgreichen Versuchen wurde die aus dem Bakterienvirus F2 isolierte RNA zu schon vorinkubierten *E. coli* Extrakten zugegeben. Sie wirkte als Matrice und förderte die Inkorporation von Aminosäuren in Protein. Einige vollständige Polypeptidketten wurden synthetisiert und von den Ribosomen freigesetzt. Diese neu hergestellten Proteinprodukte wurden dann mit dem F2 Hüllprotein, das ein Molekulargewicht von 14.000 hat, verglichen. Man fand, daß einige der *in vitro* Produkte Aminosäuresequenzen hatten, die mit denen des *in vivo* synthetisierten Hüllproteins identisch waren, was bewies, daß mRNA-Moleküle unter zellfreien Bedingungen die richtigen AS~tRNA Vorstufen auswählen können.

Kürzlich ist die zellfreie Synthese vieler verschiedener anderer viraler und bakterieller Proteine gelungen. Einer der erfolgreichsten Fälle ist T4-Lysozym, das Enzym, das bakterielle Zellwände zu verdauen hilft. Seine Synthese in biologisch aktiver Form zeigt die große Genauigkeit der Translation die heute bei *in vitro* Systemen möglich ist. Obwohl Hämoglobin in zellfreien Extrakten unreifer roter Blutzellen (Retikulozyten) erfolgreich synthetisiert wurde, sind Versuche, viele andere Zellproteine herzustellen, oft

fehlgeschlagen. Es ist anzunehmen, daß der Hauptgrund, der einen vollständigen Erfolg verhindert, unser Unvermögen ist, den Initiierungsmechanismus zu verstehen, der in höheren Zellen am Werk ist. Aber das könnte sich bald ändern und dann wird die zellfreie Synthese wichtiger Proteine von Säugetieren (z.B. Immunglobuline) Routinearbeit werden.

### STIMULATION VON AMINOSÄUREINKORPORATION DURCH SYNTHETISCHE mRNA

Während die obigen Versuche mit Virus-RNA zeigen, daß die Ablesespezifität in zellfreien Systemen erhalten bleibt, sagen sie uns allein nichts über die genaue Form des genetischen Codes. Sie können uns nicht zeigen, welche aus drei Buchstaben bestehenden Wörter (von den 64 möglichen) (Tabelle 13-1) irgendeine bestimmte Aminosäure codieren. Um solche Daten zu erhalten, benützte man synthetische Polyribonukleotide, an deren Bildung das Enzym Polynukleotid-Phosphorylase beteiligt ist. Dieses Enzym, das in allen Bakterien zu finden ist, katalysiert die Reaktion



Bei normalen Konzentrationen von Zellmetaboliten begünstigen die Gleichgewichtsbedingungen den Abbau von RNA zu Nukleosiddiphosphaten, sodaß

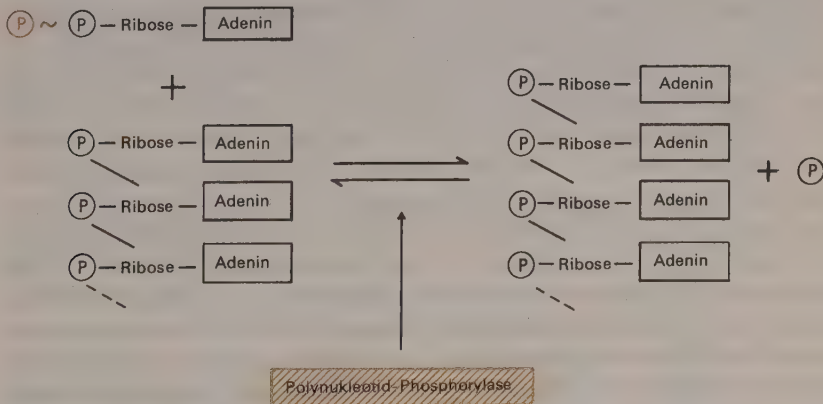
**TABELLE 13-1** Die 64 möglichen, aus drei Buchstaben bestehenden Codons

Erste Position (5'-Ende)	Zweite Position				Dritte Position (3'-Ende)
	U	C	A	G	
U	UUU	UCU	UAU	UGU	U
	UUC	UCC	UAC	UGC	C
	UUA	UCA	UAA	UGA	A
	UUG	UCG	UAG	UGG	G
C	CUU	CCU	CAU	CGU	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU	AGU	U
	AUC	ACC	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA	AGA	A
	AUG	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G



die hauptsächliche Zellfunktion der Polynukleotid-Phosphorylase die Kontrolle der Lebensdauer der mRNA sein könnte (vergleiche Kapitel 14). Wenn man jedoch hohe anfängliche Konzentrationen von Nukleosiddiphosphat verwendet, kann man erreichen, daß dieses Enzym die Bildung der 3'-5' Phosphodiesterbindungen (Abbildung 13-3) zwischen Nukleotiden katalysiert und daher synthetische RNA-Moleküle herstellt. Da es kein biosynthetisches Enzym ist, ist keine Matrizen-RNA an der RNA-Synthese beteiligt; die Basenzusammensetzung des synthetischen Produkts hängt einzig und allein von der anfänglichen Konzentration der verschiedenen Ribonukleosiddiphosphate in dem Reaktionsgemisch ab. Wenn man zum Beispiel nur Adenosindiphosphat verwendet, enthält die resultierende RNA nur Adenylnsäure und wird daher Polyadenylsäure oder Poly A genannt. Es ist ebenso möglich, Poly U, Poly C und Poly G herzustellen. Der Zusatz zweier oder mehrerer verschiedener Diphosphate ergibt gemischte Kopolymere wie Poly AU, Poly AC, Poly CU und Poly AGCU. In allen diesen gemischten Polymeren sind die Basensequenzen annähernd statistisch - die Häufigkeit des nächsten Nachbarn wird nur durch die relativen Konzentrationen der ursprünglichen Reaktanten bestimmt. Zum Beispiel werden Poly AU Moleküle mit doppelt so viel A wie U in Sequenzen wie (UAAUAUAAAUAUAUU...) gebildet.

Fast alle diese synthetischen Polymeren binden sich an die Ribosomen und fungieren als Matrizen. Einige Polymere sind keine wirkungsvollen Matrizen. Das bedeutet nicht unbedingt, daß ihnen funktionelle Basensequenzen (Codons) fehlen, sondern sie könnten inaktiv sein, weil der größte Teil ihrer Basen durch Wasserstoffbrücken gebunden ist, sodaß sie sich nicht an die Ribosomen anheften können.



**ABBILDUNG 13-3** *Synthese (Abbau) von RNA-Molekülen unter Verwendung des Enzyms Polynukleotid-Phosphorylase.*

### POLY U CODIERT POLYPHENYLALANIN

Poly U war das erste synthetische Polyribonukleotid, bei dem man mRNA Aktivität entdeckte. Seine Basen sind normalerweise in Lösung nicht durch Wasserstoffbrücken gebunden und es bindet gut an freie Ribosomen. Es wählt ausschließlich Phenylalanin-tRNA-Moleküle aus und bildet dabei eine Polypeptidkette, die nur Phenylalanin enthält (Polyphenylalanin). Daher wissen wir, daß ein Codon für Phenylalanin aus einer Gruppe von drei Uridylsäureresten (UUU) besteht (die Gruppenzahl 3 kam ursprünglich aus den in Kapitel 10 beschriebenen genetischen Versuchen). Ähnlich können wir versuchsweise (CCC) als Codon für Prolin und (AAA) als Codon für Lysin einordnen, basierend auf analogen Versuchen mit Poly C und Poly A. Unglücklicherweise binden sich die Guaninreste in Poly G fest über Wasserstoffbrücken aneinander und bilden vielsträngige, dreifache Helices, die sich nicht an Ribosomen binden. Somit kann uns diese Art von Versuchen nicht zeigen ob (GGG) ein funktionelles Codon ist.

### GEMISCHTE KOPOLYMERE ERLAUBEN ZUSÄTZLICHE CODONZUORDNUNGEN

Poly AC Moleküle können acht verschiedene Codons enthalten (CCC), (CCA), (CAC), (ACC), (CAA), (ACA), (AAC) und (AAA), deren Proportionen von dem Verhältnis von A/C im Kopolymeren abhängen. Wenn sich CA Kopolymere an Ribosomen binden, veranlassen sie den Einbau von Asparagin, Glutamin, Histidin und Threonin, zusätzlich zu Prolin, das man von den (CCC) Codons, und zu Lysin, das man von den (AAA) Codons erwartet. Die Proportionen dieser in die Polypeptidprodukte inkorporierten Aminosäuren hängen von dem A/C Verhältnis ab. Daraus schließen wir, da ein AC Kopolymeres mit viel mehr A als C den Einbau von viel mehr Asparagin als Histidinresten fördert, daß Asparagin durch zwei A und ein C und Histidin durch zwei C und ein A codiert wird (Tabelle 13-2). Ähnliche Versuche mit anderen Kopolymeren haben eine Anzahl von zusätzlichen Versuchen möglich gemacht. Diese Experimente können trotzdem die Anordnung der verschiedenen Nukleotide in einem Codon nicht aufdecken. Es gibt keine Möglichkeit, aus statistisch zusammengesetzten Kopolymeren zu schließen, ob das Histidincodon mit zwei C und einem A als (CCA), (CAC) oder (ACC) angeordnet ist. Außerdem waren, wegen der Schwierigkeit geringe Einbauraten zu interpretieren, einige der auf diese Art zustande gekommenen Zuordnungen falsch. Zum Beispiel deuteten die Versuche mit AU (1:5) darauf hin, daß Lysin durch zwei A und ein U ebenso wie durch (AAA) codiert würde. Spätere Versuche (siehe nachstehend) zeigten jedoch, daß U in allen Lysincodons fehlt.

TABELLE 13-2 Aminosäureeinbau in Proteine.

Aminosäure	Beobachteter Einbau von AS	Versuchsweise Codonzuschreibungen	Berechnete Häufigkeit von Triplets				Summe der berechneten Triplett-häufigkeit
			3A	2A1C	1A2C	3C	
<i>Poly AC (5:1)</i>							
Asparagin	24	2A 1C		20			20
Glutamin	24	2A 1C		20			20
Histidin	6	1A 2C			4,0		4
Lysin	100	3A	100				100
Prolin	7	1A 2C, 3C			4,0	0,8	4,8
Threonin	26	2A 1C, 1A 2C		20	4,0		24
<i>Poly AC (1:5)</i>							
Asparagin	5	2A 1C		3,3			3,3
Glutamin	5	2A 1C		3,3			3,3
Histidin	23	1A 2C			16,7		16,7
Lysin	1	3A	0,7				0,7
Prolin	100	1A 2C, 3C			16,7	83,3	100
Threonin	21	2A 1C, 1A, 2C		3,3	16,7		20

\* Der Aminosäureeinbau in Proteine wurde beobachtet, nachdem Kopolymere statistischer Zusammensetzung von A und C einem zellfreien Extrakt, ähnlich dem in Abbildung 13-1 beschriebenen, zugegeben wurden. Der Einbau ist in Prozenten der maximalen Inkorporation einer einzelnen Aminosäure angegeben. Diese Werte wurden dann benutzt, um versuchsweise Codons zuzuordnen, die dann verwendet wurden, um die Häufigkeit, mit der drei Nukleotide im selben Codon auftreten würden, zu berechnen. Bei diesen Berechnungen wurde die Summe der Häufigkeit der Triplets, die die maximal inkorporierte Aminosäure codierte, mit 100 festgelegt. Man nimmt an, daß Lysin, das bei einem überschuß von A am stärksten eingebaut wird, durch 3 A's codiert wird. Die relative Häufigkeit dieser Codons ist eine Funktion der Wahrscheinlichkeit, daß ein bestimmtes Nukleotid an einer bestimmten Stelle eines Codons auftreten wird. Zum Beispiel: wenn das A/C Verhältnis 5:1 ist, ist das Verhältnis AAA/AAC =  $5 \times 5 \times 5 : 5 \times 5 \times 1 = 125:25$ . Wir ordnen somit dem 3A-Codon eine Häufigkeit von 100 zu und dem 2A- und 1C-Codon eine Häufigkeit von  $25:125 = 20$ .

## BESTIMMUNG DER ANORDNUNG VON CODONS DURCH tRNA-BINDUNG

Ein direkter Weg, die Anordnung der Nukleotide innerhalb einiger Codons zu bestimmen, wurde 1964 entwickelt. Er geht von der Tatsache aus, daß sich in Anwesenheit von Proteinsynthese spezifische tRNA-Moleküle an Ribosomen-mRNA Komplexe binden. Wenn zum Beispiel Poly U mit Ribosomen vermischt wird, bindet sich nur Phenylalanin-tRNA. Dementsprechend fördert die Verknüpfung von Poly C mit Ribosomen die Bindung

von Prolin-tRNA. Von besonderer Wichtigkeit ist, daß diese spezifische Bindung die Anwesenheit langer mRNA-Moleküle nicht erfordert. Tatsächlich genügt die Bindung eines *Trinukleotids* an ein Ribosom. Die Beigabe des Trinukleotids UUU führt zur Anheftung von Phenylalanin-tRNA, während sich Lysin-tRNA spezifisch mit Ribosomen verbindet, wenn AAA beigegeben wird. Die Entdeckung des Trinukleotideffekts eröffnete unmittelbar die Möglichkeit, relativ leicht die Anordnung der Nukleotide innerhalb vieler Codons festzustellen. Vor dieser Entdeckung schien es klar, daß diese Anordnung nicht festgestellt werden könnte, bevor organische Chemiker lange Polynukleotide mit regelmäßig sich wiederholenden Sequenzen synthetisieren konnten. Jetzt hingegen genügt es, Trinukleotide bekannter Sequenzen zu haben, um die Anordnung vieler Codons zu bestimmen. Das Trinukleotid  $5'GUU^{3'}$  zum Beispiel fördert die Bindung von Valin-tRNA,  $5'UGU^{3'}$  stimuliert die Bindung von Cystein-tRNA und  $5'UUG^{3'}$  verursacht Leucin-tRNA Bindung. Nach großen Anstrengungen waren alle möglichen 64 Trinukleotide synthetisiert und man hoffte, die Anordnung der Mehrzahl der Codons definitiv feststellen zu können. In Tabelle 13-3 sind einige der auf diese Art bestimmten Codons angeführt. Es scheint jetzt wahrscheinlich, daß nicht alle richtigen Kombinationen auf diese Art bestimmt werden können. Einige der Trinukleotide binden viel weniger wirksam als UUU oder GUU und machen es unmöglich, festzustellen, ob sie eine spezifische Aminosäure codieren.

### CODONZUORDNUNG DURCH REGELMÄSSIGE KOPOLYMERE

Zur gleichen Zeit, als die Trinukleotidbindungsmethode zugänglich wurde, wurden Methoden entwickelt, die eine Kombination organisch-chemischer und enzymatischer Verfahren verwendeten, um synthetische Polyribonukleo-

**TABELLE 13-3** Bindung spezifischer tRNA-Moleküle an Trinukleotid-Ribosomen Komplexe.

Trinukleotid						tRNA-gebunden
$5'UUU^{3'}$	UUC					Phenylalanin
UUA	UUG	CUU	CUC	CUA	CUG	Leucin
AAU	AUC	AUA				Isoleucin
AUG						Methionin
GUU	GUC	GUA	GUG	UCU		Valin
UCU	UCC	UCA	UCG			Serin
CCU	CCC	CCA	CCG			Prolin
AAA	AAG					Lysin
UGU	UGC					Cystein
GAA	GAG					Glutaminsäure



tide mit bekannten, repetitiven Sequenzen herzustellen. Diese regelmäßigen Kopolymere steuern die Inkorporation spezifischer Aminosäuren in Polypeptide. Zum Beispiel ist die repetitive Sequenz CUCUCUCU... der Messenger (Bote) für ein regelmäßiges Polypeptid, in dem Leucin und Serin abwechseln. Ähnlich fördert UGUGUG... die Synthese eines Polypeptids mit zwei Aminosäuren, Cystein und Valin, und ACACAC... steuert die Synthese eines Polypeptids, in dem Threonin und Histidin abwechseln (Tabelle 13-4). Die Verwendung des Kopolymeren, das auf der Wiederholung der Trinukleotidsequenz AAG (AAGAAGAAG) aufbaut, steuert die Synthese dreier Arten von Polypeptiden: Polylysin, Polyarginin und Polyglutaminsäure. Das Auftreten aller drei Ketten zeigt, daß sich Ribosomen willkürlich mit diesen Messengern verbinden, wobei sie bei seinen AAG, AGA ebenso wie bei seinen GAA Codons beginnen können. Poly (AUC)<sub>n</sub> verhält sich ebenso; es ist eine Matrize für Polyisoleucin, Polyserin und Polyhistidin. Bis jetzt wurde eine große Zahl solcher Polymeren analysiert und die Resultate sind aus Tabelle 13-5 ersichtlich. Nur wenige Polymere mit repetitiven Tetranu-

**TABELLE 13-4** Zuordnung von Codonanordnungen unter Verwendung regelmäßiger Kopolymerer, die sich aus zwei Basen zusammensetzen.

Kopolymeres	Eingebaute Aminosäuren	Codonzuordnungen
CUC UCU CUC. ....	Leucin	5'CUC <sup>3'</sup>
	Serin	UCU
UGU GUG UGU. ....	Cystein	UGU
	Valin	GUG
ACA CAC ACA. ....	Threonin	ACA
	Histidin	CAC
AGA GAG AGA. ....	Arginin	AGA
	Glutamin	GAG

**TABELLE 13-5** Zuordnung von Codonanordnungen unter Verwendung regelmäßiger Kopolymerer, die sich aus drei Basen zusammensetzen.

Kopolymeres	Erkanntes Codon	Synthetisiertes Polypeptid	Codonzuordnung
(AAG) <sub>n</sub>	AAG AAG AAG. ...	Polylysin	5'AAG <sup>3'</sup>
	AGA AGA AGA. ...	Polyarginin	AGA
	GAA GAA GAA. ...	Polyglutaminsäure	GAA
(UUC) <sub>n</sub>	UUC UUC UUC. ...	Polyphenylalanin	UUC
	UCU UCU UCU. ...	Polyserin	UCU
	CUU CUU CUU. ...	Polyisoleucin	CUU
(UUG) <sub>n</sub>	UUG UUG UUG. ...	Polyisoleucin	UUG
	UGU UGU UGU. ...	Polycystein	UGU
	GUU GUU GUU. ...	Polyvalin	GUU

kleotidsequenzen wurden bis jetzt untersucht. Die Codonzuordnungen, die für zwei von ihnen erhalten wurden, werden in Tabelle 13-6 gezeigt. Die Summe all dieser Beobachtungen erlaubt die definitive Zuordnung spezifischer Aminosäuren zu 61 von den möglichen 64 Codons (Tabelle 13-7). Die restlichen drei Codons codieren, wie unten gezeigt wird, den Kettenabschluß.

**TABELLE 13-6** Zuordnung von Codonanordnungen unter Verwendung regelmäßiger Kopolymerer, die sich aus vier Basen zusammensetzen

Kopolymeres	Eingebaute Aminosäuren	Codonzuordnungen
UAU CUA UCU AUC UAU...	Tyrosin Leucin Serin Isoleucin	<sup>5'</sup> UAU <sup>3'</sup> CUA UCU AUC
UUA CUU ACU UAC UUA...	Leucin Leucin Threonin Tyrosin	UUA CUU ACU UAC

**TABELLE 13-7** Der genetische Code.

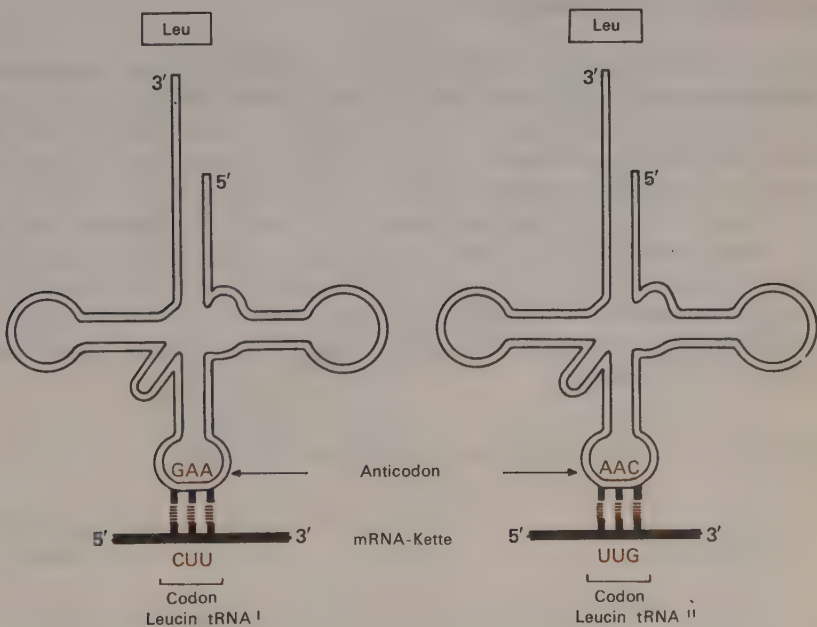
Erste Position (5'-Ende)	Zweite Position				Dritte Position (3'-Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term <sup>a</sup>	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	GluN	Arg	A
	Leu	Pro	GluN	Arg	G
A	Ileu	Thr	AspN	Ser	U
	Ileu	Thr	AspN	Ser	C
	Ileu	Thr	Lys	Arg	A
	Meth	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

<sup>a</sup> Kettenabschluß-Codon (früher «nonsense» genannt).

## DER CODE IST ENTARTET

Viele Aminosäuren werden durch mehr als ein Codon ausgewählt (Entartung). Zum Beispiel codieren sowohl (UUU) als auch (UUC) Phenylalanin, während Serin durch (UCU), (UCC), (UCA), (UCG), (AGU) und (AGC) codiert wird. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß, wenn die ersten beiden Nukleotide identisch sind, das dritte Nukleotid entweder Cytosin oder Uracil sein kann und das Codon dennoch dieselbe Aminosäure codiert. Oft sind Adenin und Guanin ähnlich austauschbar. Jedoch scheint nicht die gesamte Entartung darauf zu basieren, daß die ersten beiden Nukleotide identisch sind. Leucin zum Beispiel scheint durch (UUA) und (UUG) ebenso wie durch (CUU), (CUC), (CUA) und (CUG) codiert zu werden (Abbildung 13-4).

Die Entartung der Codons, besonders die häufige Gleichwertigkeit von Cytosin und Uracil und Guanin und Adenin an dritter Stelle, unterliegt der Tatsache, daß die AT/GC Verhältnisse sehr große Variationen zeigen können (vergleiche Kapitel 9), ohne entsprechend große Veränderungen in der relativen Proportion der Aminosäuren in all diesen Organismen. Die



**ABBILDUNG 13-4** Zwei verschiedene tRNA-Moleküle, die Leucinreste aufnehmen. Jedes erkennt ein anderes Codewort.

ursprüngliche Erklärung war, daß diese Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung der Aminosäuren ohne Bedeutung wären und nur die Sequenzen jener Gene widerspiegeln, die besonders häufige Proteine codierten. Aber als die Analyse von weiteren individuellen Proteinen keine Korrelation zwischen Aminosäurezusammensetzung und entwicklungsgeschichtlicher Stufe ergab, wurde diese Interpretation unhaltbar.

Anfangs dachte man auch, daß für jedes Codon ein spezifisches Anticodon existiere. Wenn das der Fall wäre, würde es zumindest 61 verschiedene tRNA, möglicherweise mit drei zusätzlichen für die kettenabschließenden Codons, geben. Es tauchten jedoch bald Beweise dafür auf, daß eine hochgereinigte tRNA Spezies mit bekannter Sequenz (z.B. Alanin-tRNA) mehrere verschiedene Codons erkennen kann. Man fand auch mehrere Fälle, bei denen eine Anticodonbase nicht eine der vier üblichen, sondern eine fünfte Base, Inosin, war. Wie alle anderen seltenen tRNA-Basen entsteht diese durch die enzymatische Modifikation einer Base in einer sonst vollständigen tRNA. Die Base, von der sie abgeleitet ist, ist Adenin, deren 6-Aminogruppe desaminiert wird, um die 6-Ketogruppe des Inosins zu ergeben.

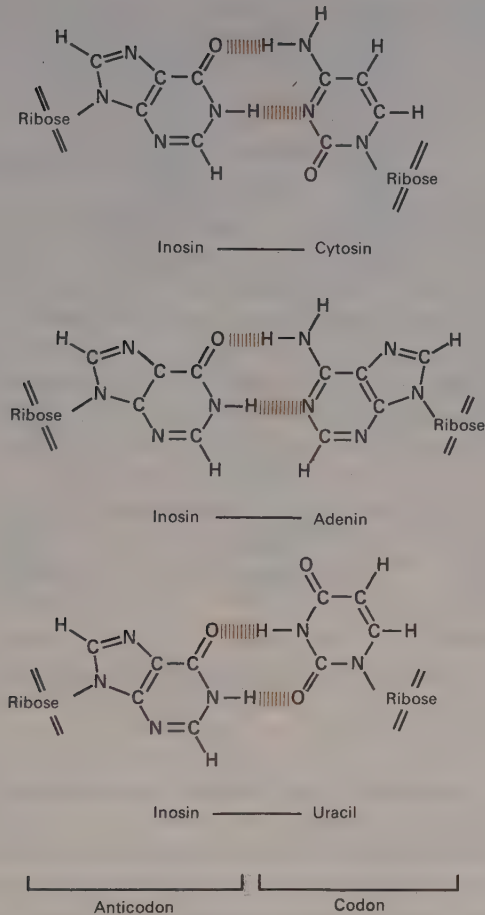
#### DER «WOBBLE» IM ANTICODON

Um diese Beobachtungen zu erklären, wurde das Modell des sogenannten «Wobble» entworfen. Es besagt, daß die Base am 5'-Ende des Anticodons räumlich nicht so beschränkt ist wie die anderen beiden, was ihr erlaubt, Wasserstoff-Brückenbindungen mit jeder der verschiedenen Basen am 3'-Ende eines Codons einzugehen. Nicht alle Kombinationen sind möglich, die Paarung ist auf jene beschränkt, die in Tabelle 13-8 gezeigt werden. Zum Beispiel kann sich U in der Wobble-Position mit Adenin und Guanin paaren, während I sich mit U, C und A paaren kann (Abbildung 13-5). Diese Regeln erlauben nicht, daß irgendein einzelnes tRNA-Molekül vier verschiedene Codons erkennt; drei Codons werden nur erkannt, wenn Inosin die dritte Stelle einnimmt.

**TABELLE 13-8** Paarungskombinationen nach dem «Wobble»-Konzept.

Base im Anticodon	Base im Codon
G	U oder C
C	G
A	U
U	A oder G
I	A, U oder C

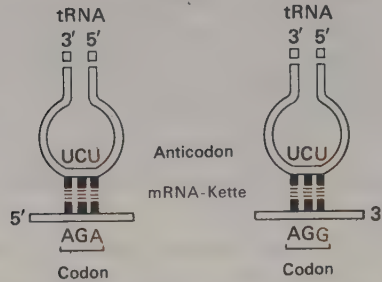




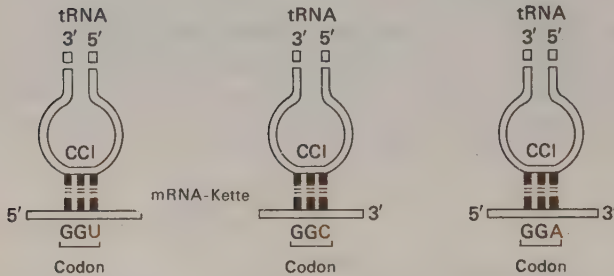
(a) «Wobble» ermöglicht es dieser Base, mit anderen Basen als jenen, die bei der Basenpaarung üblich sind, Wasserstoffbrücken-Bindungen einzugehen.

**ABBILDUNG 13-5** Beispiele für «Wobblepaarung».

Praktisch alle derzeit vorhandenen Daten unterstützen das Wobble-Konzept. Zum Beispiel sagte es korrekt voraus, daß zumindest drei tRNAs für die sechs Serin-Codewörter (UCU, UCC, UCA, UCG, AGU und AGC) existieren. Die zwei anderen Aminosäuren (Leucin und Arginin), deren entar-



b) U in dritter Anticodon-Position kann sich mit A oder G paaren.



c) I in dritter Anticodon-Position kann sich mit U, C oder A paaren.

ABBILDUNG 13-5 (Fortsetzung).

tete Codons sich in erster oder zweiter Position unterscheiden, haben ebenfalls verschiedene tRNAs für jeden Satz.

Während der «Wobble» erlaubt, daß eine bestimmte Base mehrere Basen erkennt, zeigt die Bindungseffizienz beträchtliche Unterschiede. In einem bestimmten Organismus wird eine Base vorzugsweise für eine bestimmte Aminosäure benutzt. Wenn das verwendete Codewort eine viel geringere Bindungswirksamkeit hat, könnte man erwarten, daß die Geschwindigkeit, mit der die entsprechende Aminosäure in Proteine eingebaut wird, niedriger ist. Wenn sich diese Vermutung als richtig erweist, wird die Syntheserate eines bestimmten Proteins (vergleiche Kapitel 14) teilweise dadurch kontrolliert, welche Codons seine besondere Aminosäuresequenz steuern.

Vor kurzer Zeit wurde ein spezifisches molekulares Modell für die Anticodonschlinge vorgeschlagen. Die verschiedenen Atome wurden so angeordnet, daß die Bildung interner schwacher Wechselwirkungen (zwischen Atomen derselben Kette) maximiert wurde. Besonders wichtig ist es, die flache Oberfläche der Basen in möglichst nahen Kontakt zu bringen. In dem resultierenden Modell hat die dritte Anticodonbase viel mehr Bewegungsfreiheit

als die anderen zwei Basen - daher tritt in dritter Position «Wobble» auf. Dieser Punkt kann jedoch nicht als bewiesen angesehen werden, bis mehrere 3D-Strukturen im Detail ausgearbeitet werden.

### SELTENE tRNA-SPEZIES

Manchmal haben mehrere, chemisch verschiedene tRNA-Spezies das gleiche Anticodon. Oft ist der einzige Unterschied zwischen zwei Spezies das Vorhandensein oder das Fehlen der 3'-terminalen Adenylsäure. Innerhalb von Zellen ist dieser Unterschied nicht permanent, denn es gibt ein «hinzufügendes Enzym», das abschließende Adenylsäurereste an jene Moleküle anfügt, denen sie fehlen. Warum einigen tRNA-Molekülen ihre 3'-terminalen Reste fehlen, ist noch völlig unerforscht. Vielleicht wurde das ursprüngliche Fehlen durch einen zufälligen Angriff einer Exonuklease verursacht; in diesem Fall hat das hinzufügende Enzym eine Reparaturfunktion. Aber es ist anzunehmen, daß die Abwesenheit irgendwie mit der Steuerung der allgemeinen Proteinsyntheserate zu tun hat, da die unvollständigen Moleküle unfähig sind, ihre spezifischen Aminosäuren aufzunehmen.

Viel verwirrender sind Fälle, bei denen Unterschiede in der internen Sequenz auftreten und bei denen eine Spezies, im Vergleich zu den anderen Arten, in sehr großer Menge vorhanden ist. Es gibt zum Beispiel eine häufig und eine seltene Tyrosin-tRNA und beide besitzen das Anticodon  $3'AUG^5'$ . Durch die Beschaffenheit der Sequenzunterschiede ist es ausgeschlossen, daß die seltene Komponente durch enzymatische Modifikation der hauptsächlichen Komponente nach der Gentranskription herrührt. Sie können nicht durch irgendwelche bekannten enzymatischen Veränderungen entstehen. Die normale Funktion, die diese seltenen tRNA Arten erfüllen, ist noch nicht bekannt, aber wie wir weiter unten sehen werden, spielen sie häufig bei der Wirkung von Suppressorgen eine Rolle.

### AUG UND GUG ALS INITIIERUNGS-CODONS

Die Entdeckung einer für N-Formyl-methionin spezifischen tRNA wies ursprünglich darauf hin, daß sie ein Codon erkennen würde, das vom AUG-Methionin-Codon verschieden ist. Aber sogar am Anfang erschien diese Vermutung weit hergeholt, da es kein nicht zugeordnetes Codon gab, das sich spezifisch an f-Met-tRNA binden könnte. Wie in Abbildung 12-12 gezeigt wurde, ergab die Aufklärung der f-Met-tRNA Sequenz, daß ihr Anticodon  $3'UAC^5'$  mit dem der Met-tRNA identisch war. Daher müssen sowohl f-Met und Met direkt durch AUG codiert werden. So muß auf

irgendeine Art und Weise das Signal für die erste Aminosäure von komplexerer Natur sein als das Signal für alle anderen Aminosäuren. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß man aufgrund von *in vitro* Studien mit regelmäßigen Kopolymeren vermutet, daß f-Met-tRNA sich mit GUG ebenso gut wie mit AUG Codons verbindet und die Synthese auslöst. Normalerweise ist GUG ein Valin-Codon und seine Erkennung durch f-Met-tRNA deutet auf eine andere Art von Wobble am f-Met-Anticodon hin. Im Gegensatz zur dritten Position bestünde hier die Auswahlmöglichkeit in der ersten. Ein möglicher Grund dafür liegt in der f-Met-tRNA Sequenz. Das dem 3'-Ende des Anticodons benachbarte Nukleotid ist ein nicht modifiziertes Adenin, nicht das voluminöse alkylierte Derivat, das in fast allen anderen tRNAs zu finden ist.

*In vitro* sind GUG Startpunkte viel weniger wirkungsvoll als AUG Startpunkte. Es müssen mehr Gene analysiert werden, bevor die Rolle des GUG klar wird. Wenn es verwendet wird, könnte seine geringere Affinität für f-Met-tRNA eine Möglichkeit bieten, die Geschwindigkeit, mit der ein bestimmtes Gen funktioniert, zu kontrollieren.

### CODONS FÜR DEN KETTENABSCHLUSS

Die drei Codons UAA, UAG und UGA entsprechen keiner Aminosäure, sondern sie zeigen den Kettenabschluß (Termination) an. Wie schon in Kapitel 12 erwähnt wurde, werden diese Codons nicht durch spezielle kettenabschließende tRNAs gelesen, sondern durch spezifische Proteine, die Freisetzungsfaktoren (release factors). Bis jetzt wurden zwei Freisetzungsfaktoren identifiziert, die je zwei Codons erkennen. Einer ist spezifisch für UAA und UAG und der andere für UAA und UGA. Erst detaillierte Kenntnisse ihrer 3D-Strukturen werden darüber Auskunft geben, wie zwei verschiedene Codons durch jeden Freisetzungsfaktor erkannt werden können. Die Verwendung von Proteinen, um die Stoppsignale zu erkennen, unterstreicht eine Tatsache, die von vielen Biochemikern ignoriert wird. Die spezifischen Gruppen, die Wasserstoff-Brückenbindungen auf einem Polynukleotid eingehen, können auch von jenen Aminosäuren erkannt werden, die zur Bildung von Wasserstoffbrücken neigen.

### BEENDIGUNG EINER BOTSCHAFT FÜR EIN POLYPEPTID DURCH ZWEI AUF EINANDERFOLGENDE STOPPCODONS

Ursprünglich nahm man an, daß alle Gene mit einem einzigen Stoppcodon endeten. Daraus ergaben sich viele Spekulationen, warum es drei verschiedene gäbe und welches am häufigsten verwendet würde. So wurde die Aufklärung



der Nukleotidsequenzen an den Enden der tatsächlichen Gene mit Spannung erwartet. Vor sehr kurzer Zeit ergab sich die erste Antwort aus der Analyse des Gens, das ein Hüllprotein des RNA Phagen R17 codiert. Die Nukleotidsequenz, die bestimmt wurde (Abbildung 13-6), enthält sowohl die Codons für die letzten sechs Aminosäuren des Hüllproteins als auch die Anfangsnukleotide im benachbarten Gen, das die Phagen-spezifische Synthetase codiert (siehe Kapitel 15). Überraschenderweise schließt das Hüllproteingen mit UAAUAG. Somit beenden zwei Stoppcodons dieses Gen. Bevor nicht eine Anzahl von Genen in ähnlicher Weise analysiert wird, bleibt unbekannt, ob das häufig vorkommt.

Sicherlich sind nicht immer zwei Stoppcodons erforderlich. Das häufige Auftreten von Nonsense-Mutationen (siehe unten), die neue Stoppsignale innerhalb existierender Gene hervorrufen, zeigt, daß ein einziges Stoppcodon das Wachstum der meisten Polypeptidketten beendet. Somit ist es möglich, daß sich aufeinanderfolgende Stoppcodons als Sicherheitsmaßnahme entwickelt haben, um in jenen seltenen Fällen einzugreifen, wo das erste Stoppcodon versagt. Ob die Effizienz der Freisetzungsfaktoren, Codons zu erkennen genau so groß ist wie die der tRNA, ist ein wichtiger Punkt, der noch aufgeklärt werden muß.

### «NONSENSE»- GEGENÜBER «MISSENSE»-MUTATIONEN

Eine Änderung in einem für eine bestimmte Aminosäure spezifischen Codon, sodaß es eine andere Aminosäure spezifiziert, wird *Missense-Mutation* genannt. Die Veränderung in einem Kettenschlußcodon wird ihrerseits *Nonsense-Mutation* genannt. Wenn man die Existenz von nur drei kettenabschließenden Codons annimmt, resultieren die meisten Veränderungen unter Austausch einer einzigen Base eher in Missense- als in Nonsense-Mutationen. Da neue Proteine, die durch Missense-Mutationen entstehen, nur einen einzigen Aminosäureaustausch enthalten, weisen sie häufig etwas von der biologischen Aktivität der ursprünglichen Proteine auf. Die abnormalen Hämoglobine (siehe Kapitel 4) sind das Resultat von Missense-Mutationen.

Tabelle 13-9 zeigt, daß die Daten über den Aminosäureaustausch, die man von diesen veränderten Hämoglobinmolekülen erhalten hat, deutlich dafür sprechen, daß diese Mutationen aus der Substitution einzelner Nukleotide resultieren. Zum gleichen Schluß führt eine entsprechende Liste der Austauschreaktionen (Tabelle 13-10), die man von mutierten TMV Proteinmolekülen erhielt. Außerdem unterstützt die Tatsache, daß nur gewisse spezifische Veränderungen beobachtet wurden (z.B. Glycin zu Asparaginsäure), die Hypothese, daß diese veränderten Proteine auf einzelnen Nukleotidveränderungen beruhen. Wenn die meisten beobachteten Mutationen Verände-

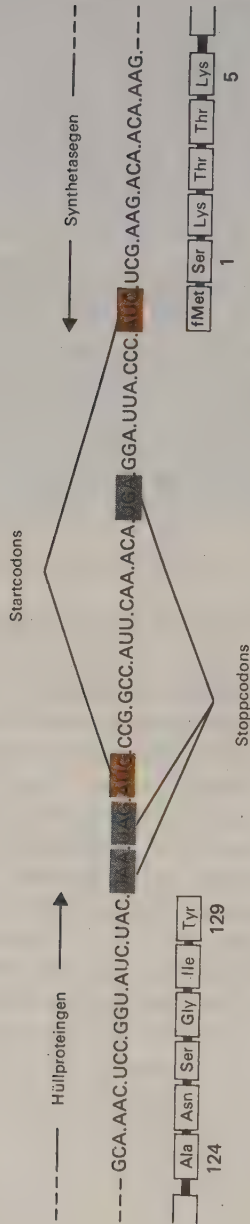


ABBILDUNG 13-6

Eine Sequenz von 72 Nukleotiden mit dem Ende des R17 Hüllproteins und dem Anfang des Synthetasegens. Die Stoppcodons sind ebenso wie die AUG Startcodons skizziert. Auf das zweite Stoppcodon für das Hüllprotein folgt ein AUG Codon, dann sechs Triplets, später ein UGA Abschlußcodon. Es ist noch nicht sicher, ob dieses Segment das Hexapeptid fMet-Pro-Ala-Ile-Gln-Thr codiert.

**TABELLE 13-9** Beispiele möglicher Codonveränderungen, die dem Austausch einiger Aminosäuren in mutierten Hämoglobinen zugrunde liegen.

Aminosäure in normalem Hämoglobin		Aminosäure in mutiertem Hämoglobin	
Lysin (AAA)	—————→	Glutaminsäure (GAA)	A → G
Glutaminsäure (GAA)	—————→	Glutamin (CAA)	G → C
Glycin (GGU)	—————→	Asparaginsäure (GAU)	G → A
Histidin (CAU)	—————→	Tyrosin (UAU)	C → U
Asparagin (AAU)	—————→	Lysin (AAA)	U → A
Glutaminsäure (GAA)	—————→	Valin (GUA)	A → U
Glutaminsäure (GAA)	—————→	Lysin (AAA)	G → A
Glutaminsäure (GAA)	—————→	Glycin (GGA)	A → G

**TABELLE 13-10** Aminosäureaustausch durch Behandlung von TMV mit salpetriger Säure<sup>a</sup>

Prolin (CCC)	—————→	Serin (UCC)	C → U
Prolin (CCC)	—————→	Leucin (CUC)	C → U
Isoleucin (AUU)	—————→	Valin (GUU)	A → G
Isoleucin (AUA)	—————→	Methionin (AUG)	A → G
Leucin (CUU)	—————→	Phenylalanin (UUU)	C → U
Glutaminsäure (GAA)	—————→	Glycin (GGA)	A → G
Threonin (ACA)	—————→	Isoleucin (AUA)	C → U
Threonin (ACG)	—————→	Methionin (AUG)	C → U
Serin (UCU)	—————→	Phenylalanin (UUU)	C → U
Serin (UCG)	—————→	Leucin (UUG)	C → U
Asparaginsäure (GAC)	—————→	Glycin (GGC)	A → G

<sup>a</sup> Alle beobachteten Veränderungen stimmen sowohl mit den möglichen Codonzuordnungen als auch mit den postulierten mutagenen Wirkungen der salpetrigen Säure (C → U, A → G) überein.

rungen in jedem der verschiedenen benachbarten Nukleotide widerspiegeln, wäre eine größere Vielfältigkeit im Aminosäureaustausch zu beobachten.

### **NONSENSE-MUTATIONEN FÜHREN ZU UNVOLLSTÄNDIGEN POLYPEPTIDKETTEN**

Wenn eine Nonsense-Mutation in der Mitte einer genetischen Botschaft auftritt, werden unvollständige Polypeptide von den Ribosomen freigesetzt. Sehr oft haben diese unvollständigen Ketten keine biologische Aktivität (z.B. keine enzymatische Wirkung), was die meisten Nonsense-Mutationen in lebenswichtigen Genen leicht erkennen läßt. Im Gegensatz dazu hat die Mehrzahl der Missense-Mutationen eine gewisse biologische Aktivität und wird für gewöhnlich übersehen. Somit ist, nach der Behandlung mit einem Mutagen, ein ziemlich großer Anteil der *erkennbaren* Mutationen vom Nonsense-Typ.

Die Größe der unvollständigen Polypeptidkette, die hergestellt wird, hängt von dem relativen Ort der Nonsense-Mutationen ab. Mutationen, die nahe dem Beginn eines Gens auftreten, resultieren in sehr kurzen Fragmenten, wenn der Ort jedoch am Ende liegt, ist das Fragment fast von normaler Länge und kann eine gewisse biologische Aktivität haben. Diese Tatsache bietet einen Weg, eine Mutation innerhalb eines gegebenen Gens genau zu lokalisieren. Die Isolierung einer Reihe von unvollständigen Fragmenten und Messungen ihrer Länge zeigen uns eindeutig den Ort der entsprechenden Mutationen.

### **BEI ZELLFREIER PROTEINSYNTHESE KÖNNEN LESEFEHLER AUFTRETEN**

Unter bestimmten Bedingungen können Lesefehler in zellfreien Systemen sehr häufig sein. Bald nach der Entdeckung, daß Poly U die Matrize für Polyphenylalanin ist, ergab sich das scheinbare Paradoxon, daß Poly U Matrizen in Abwesenheit von Phenylalanin zur Synthese von Polyleucin führten. Das bedeutet, daß das (UUU) Codon Leucin-spezifische tRNA-Moleküle auswählte. Zuerst erwog man die Möglichkeit, daß eine fundamentale Zweideutigkeit im (UUU) Codon existieren könnte. Jetzt jedoch ist klar, daß die anomale Leucininkorporation auf die Verwendung von übergroßen Mengen von  $Mg^{2+}$  bei den Inkorporationsversuchen zurückzuführen ist. Wenn die  $Mg^{2+}$  Konzentration gesenkt wird, wird die durch Poly U gesteuerte Leucininkorporation seltener. Dieses Resultat ist wichtig, da es unterstreicht, wie notwendig es ist, bei Versuchen mit zellfreien Systemen unter



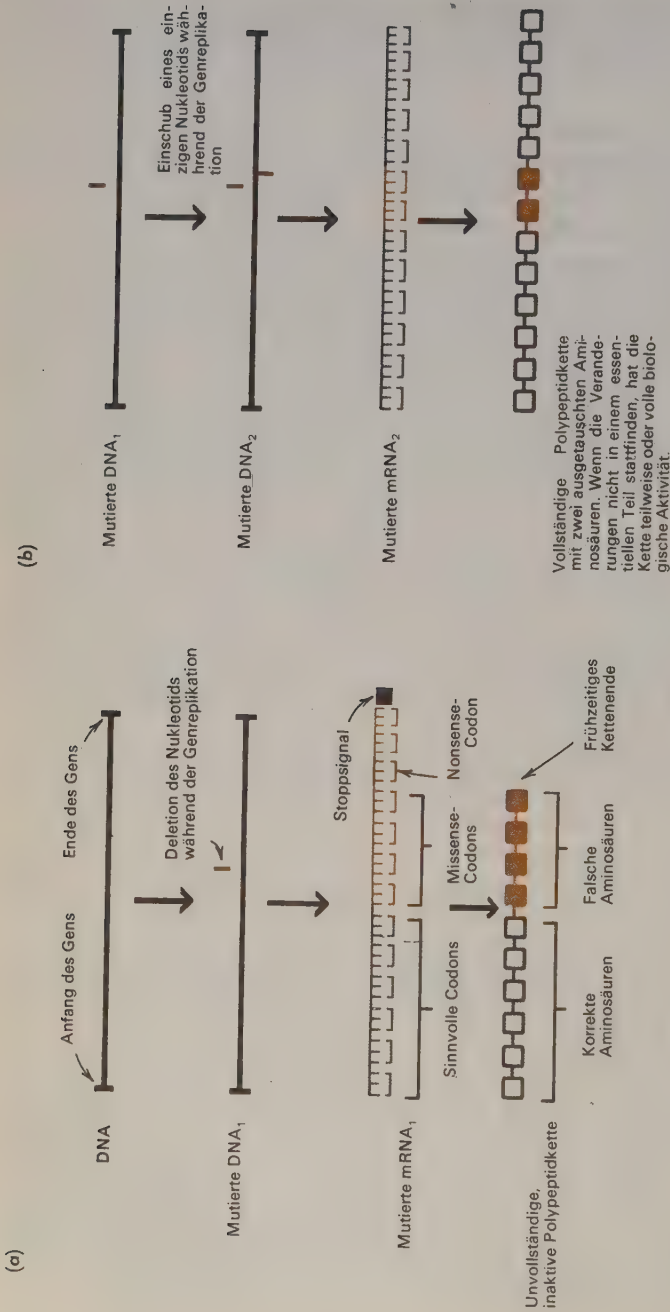
normalen physiologischen Bedingungen zu arbeiten, wenn wir auf die innerhalb einer normalen Zelle stattfindenden Vorgänge rückschließen wollen.

## SUPPRESSORGENE STÖREN DIE ABLESUNG DES GENETISCHEN CODES

Auch in lebenden Zellen kommt es zu Fehlern beim Ablesen des genetischen Codes. Diese Fehler liegen dem Phänomen von Suppressorgenen zugrunde. Viele Jahre war ihre Existenz ziemlich rätselhaft und anscheinend paradox. Eine Anzahl von Beispielen war bekannt, bei denen die Auswirkungen schädlicher Mutationen durch eine zweite genetische Veränderung rückgängig gemacht wurden. Einige dieser nachfolgenden Mutationen waren sehr leicht als einfache Rückmutationen zu verstehen, die eine veränderte Nukleotidsequenz in ihre ursprüngliche Anordnung zurückführen. Viel schwieriger zu verstehen waren andere Mutationen, die an verschiedenen Orten auf dem Chromosom auftreten; sie unterdrücken die Veränderung aufgrund der Mutation an Ort A, indem sie eine zusätzliche genetische Veränderung an Ort B erzeugen. Solche *Suppressormutationen* lassen sich in zwei Hauptkategorien teilen: jene, die auf Nukleotidveränderungen innerhalb desselben Gens wie die ursprüngliche Mutation, aber an einem anderen Ort auf diesem Gen beruhen (intragene Suppression) und jene, die in einem anderen Gen auftreten (intergene Suppression). Gene, die die Unterdrückung (Suppression) von Mutationen in anderen Genen hervorrufen, werden *Suppressorgene* genannt.

Wir wissen heute, daß beide Arten von Suppression wirken, indem sie die Erzeugung intakter (oder teilweise intakter) Kopien des Proteins veranlassen, das durch die ursprüngliche schädliche Mutation inaktiv gemacht wurde. Wenn zum Beispiel die erste Mutation die Produktion von inaktiven Kopien eines der Enzyme veranlaßte, das an der Synthese von Arginin beteiligt ist, dann erlaubt die Suppressormutation die Bildung von Arginin, indem sie die Synthese einiger intakter Kopien desselben Enzyms wiederherstellt. Die Mechanismen, durch die intergene und intragene Suppressormutationen wieder die Synthese von intakten Proteinen veranlassen, sind jedoch vollkommen verschieden.

Diejenigen Mutationen, die durch zusätzliche Veränderungen in demselben Gen aufgehoben werden können, sind oft auf die Insertion oder Deletion eines einzigen Nukleotids zurückzuführen. Diese verändern den Leseraster (siehe Kapitel 10) so, daß alle auf die Insertion (oder Deletion) folgenden Codons vollständig verändert werden, wodurch neue Aminosäuresequenzen entstehen. Seltener ruft der veränderte Leseraster frühzeitige Nonsense-Codons hervor und führt dazu, daß die mutierten Polypeptide dementsprechend kürzer sind (Abbildung 13-7).



**ABBILDUNG 13-7** (a) Die Auswirkungen einer Mutation aufgrund von Deletion (Insertion) eines einzigen Nukleotids auf das Ablesen der genetischen Botschaft.  
(b) Der Mechanismus, durch den eine Mutation aufgrund von Insertion (Deletion) eines Nukleotids das Durcheinander unterdrücken kann, das durch eine frühere Deletions-(Insertions-) Mutation hervorgerufen wurde.

Intragene Suppression kann auftreten, wenn durch eine zweite Mutation ein neues Nukleotid nahe der ursprünglichen Veränderung verloren geht (oder eingeschoben wird) und damit die ursprüngliche Codonanordnung jenseits der zweiten Veränderung wiederhergestellt wird (Abbildung 13-7). Obwohl zwischen den zwei Veränderungen noch Codons vorhanden sind, die sich von den normalen unterscheiden, ist es sehr wahrscheinlich, daß wegen der Degeneration des Codes alle irgendeine Aminosäure codieren. Wenn das der Fall ist, könnten oft funktionsfähige Proteine vollständiger Länge erzeugt werden.

Intragene Suppressoren können auch von einer zweiten Missense-Mutation herrühren. In diesen Fällen ist der ursprüngliche Verlust von enzymatischer Aktivität auf eine veränderte 3D-Konfiguration, die aus der Anwesenheit einer falschen Aminosäure resultiert, zurückzuführen. Eine zweite Missense-Mutation im selben Gen stellt die biologische Aktivität wieder her, wenn sie die ursprüngliche Konfiguration rund um den funktionellen Teil des Gens irgendwie wiederherstellt. Ein Beispiel für diese Art der Suppression im Tryptophansynthetasesystem wurde in Kapitel 8 gezeigt (Abbildung 8-13).

#### **SPEZIFISCHE CODONS WERDEN DURCH SPEZIFISCHE SUPPRESSORGENE FALSCH GELESEN**

Suppressorgene wirken nicht, indem sie die Nukleotidsequenzen der mutierten DNA ändern, sondern sie ändern die Art, auf die die mRNA-Matrizen gelesen werden. Es gibt eine Anzahl von verschiedenen Suppressorgenen in *E. coli*. Da jedes eine falsche Ablesung spezifischer Codons verursacht, können sie nur die Auswirkungen eines kleinen Teils der einzelnen Nukleotidveränderungen innerhalb eines bestimmten Gens rückgängig machen. Wenn wir zum Beispiel eine große Anzahl von Mutationen sammeln, die die Synthese des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase blockieren (siehe Kapitel 14), werden nur einige Prozent der Mutationen durch ein gegebenes Suppressorgen a unterdrückt. Diese wenigen Mutationen sind auf Veränderungen in Codons zurückzuführen, deren Ablesung spezifisch durch Gen a beeinflußt wird. In ähnlicher Weise können völlig andere  $\beta$ -Galactosidase-Mutationen durch das Suppressorgen b unterdrückt werden.

Im allgemeinen ist zu beobachten, daß ein gegebenes Suppressorgen Mutationen in einer Anzahl verschiedener Gene unterdrücken kann. Diese Tatsache kann man leicht verstehen, wenn man Ablesefehler annimmt. Zum Beispiel kann die Fähigkeit, sowohl Arginin als auch Tryptophan in gewissen Doppelmутanten zu synthetisieren, die keine der beiden Aminosäuren mehr produzieren können, durch eine einzige Veränderung in einem Suppressorgen

wiederhergestellt werden. Wir brauchen nur zu postulieren, daß diese beiden Wachstumserfordernisse durch dieselben spezifischen Veränderungen, zu Missense oder Nonsense, verursacht werden.

#### AN DER NONSENSE SUPPRESSION SIND MUTIERTE tRNAs BETEILIGT

Es gibt Suppressorgene für jedes der drei kettenabschließenden Codons. Sie wirken, indem sie ein Stoppsignal ablesen, als ob es ein Signal für eine spezifische Aminosäure wäre. Es gibt zum Beispiel drei gut charakterisierte Gene, die das UAG Codon unterdrücken. Ein Suppressorgen schiebt Serin an der Nonsense-Stelle ein, ein anderes Glutamin und ein drittes Tyrosin. Alle wirken, indem sie in einer Spezies von tRNA, die für eine bestimmte Aminosäure spezifisch ist, Veränderungen im Anticodon erzeugen. Der Tyrosin-Suppressor, zum Beispiel, entsteht durch eine Mutation im Bereich des Anticodons, die es von  $3'AUG^{5'}$  zu  $3'AUC^{5'}$  verändert und es dabei befähigt, UAG Codons zu erkennen (Abbildung 13-8).

Die tRNA-vermittelte Suppression wurde zuerst mit einer Nonsense-Mutation gezeigt, die die Synthese des Hüllproteins des RNA Phagen R17 blockierte. Wenn mutierte RNA, die dieses Nonsense-Codon enthielt, in einem *in vitro* System verwendet wurde, wurde kein Hüllprotein erzeugt, außer wenn man gereinigte tRNA vom richtigen Suppressorstamm zugab.

Die Entdeckung der tRNA-vermittelten Suppression warf die Frage auf, wie zum Beispiel das normale Tyrosin-Codon weiterhin gelesen werden kann. Die Antwort liegt in der Entdeckung, daß normalerweise zwei Gene Tyrosin-tRNA codieren. Eins codiert die hauptsächliche Komponente, das andere eine Komponente, die in viel geringeren Mengen vorhanden ist und die von der Suppressormutation betroffen ist. Außerdem wurde beobachtet, daß die Suppressormutationen am häufigsten in jenen Stämmen auftreten, in denen das Gen, das zur selteneren tRNA-Spezies führt, dupliziert wird (in zwei Kopien vorhanden ist). Stämme mit der Duplikation werden selektiert, weil der Verlust der selteneren Komponente zwar für die Wirtszelle nicht letal ist, aber ihr Wachstum verlangsamt. Die eigentliche Funktion der selteneren Komponente ist noch immer ein völliges Rätsel. Es ist denkbar, daß sie eine regulierende Rolle spielt und somit nur eine geringe Menge davon vorhanden zu sein braucht.

Die Suppression der UAG und auch der UGA Codons ist sehr effizient. In Anwesenheit der Suppressor tRNAs werden mehr als die Hälfte der kettenabschließenden Signale als spezifische Aminosäurecodons gelesen. Im Gegensatz dazu ist die Suppression des UAA Codons nie sehr effizient, und beträgt im Durchschnitt zwischen 1 und 5 Prozent. Anfangs glaubte man, daß die wirkungsvolle Unterdrückung von UAG und UGA bedeutet, daß sie selten, wenn überhaupt, als normales Abschlußsignal diene.



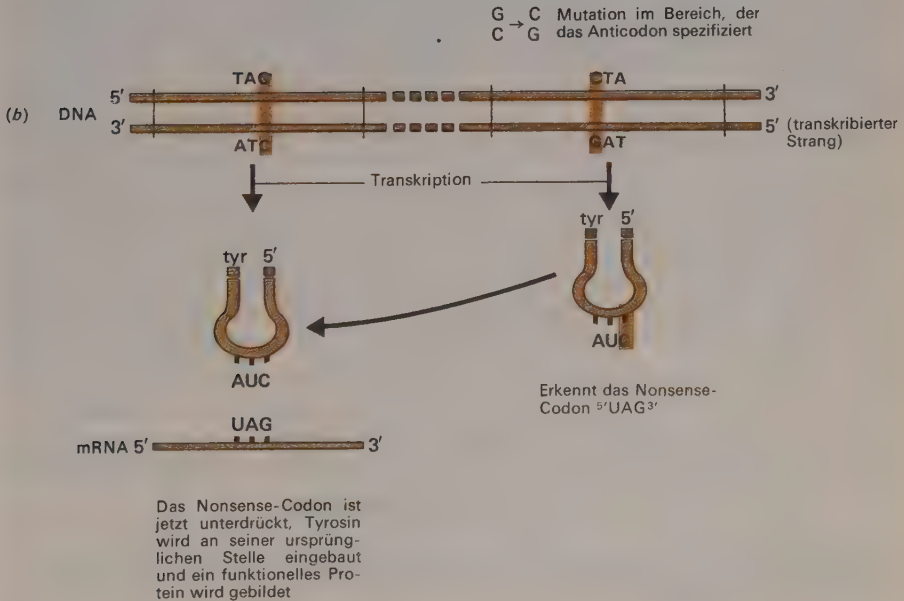
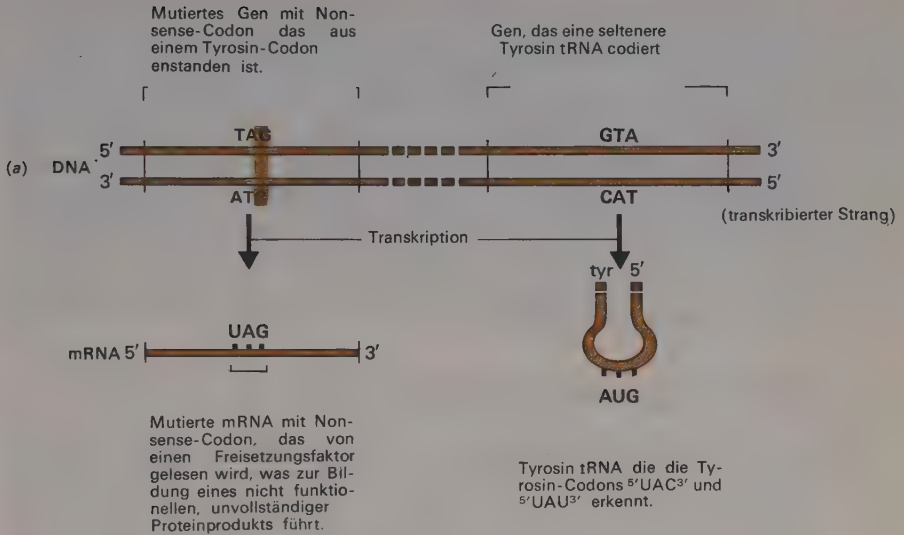


ABBILDUNG 13-8 Schematische Darstellung der Wirkung einer selteneren Tyrosin tRNA Komponente als Nonsense-Suppressor.

sie häufig verwendet, müßte das Vorhandensein ihrer spezifischen Suppression einen großen Teil des normalen Kettenabschlusses verhindern, was zu der Erzeugung von überlangen Polypeptiden und zum Aufhören des Zellwachstums führen würde. Jetzt hingegen, wo ein doppeltes Stoppsignal beobachtet wurde, ist es leichter zu verstehen, warum die UAG- und UGA-Suppression keine Auswirkung auf das bakterielle Wachstum hat. Wir brauchen nur zu postulieren, daß die Stoppcodons fast nie einzeln auftreten. Der Fall des UAA Suppressors ist weniger klar, da sein Vorhandensein die Wachstumsrate immer verlangsamt. Vielleicht schließt irgendein Gen mit UAA allein ab. Es sind noch viel mehr Sequenzdaten notwendig, um eine klare Antwort zu erhalten.

### **tRNA-VERMITTELTE MISSENSE-SUPPRESSION**

Die Suppression von Missense-Mutationen kann ebenfalls durch mutierte tRNAs vermittelt werden. Das wurde vor kurzer Zeit für eine Mutation im Tryptophan-Synthetase A Gen bewiesen, die Glycin durch Arginin ersetzt (siehe Kapitel 8) und dabei zu einem inaktiven Enzym führt. Es gibt Suppressormutationen, die den Einbau von Glycin an dem neu erworbenen Argininort veranlassen und dadurch die Enzymfunktion wiederherstellen. Die Wirksamkeit der Suppression ist gering; so werden in Gegenwart des Suppressorgens sowohl aktive als auch inaktive Formen des Enzyms hergestellt. Die Beschaffenheit dieser Suppression wurde untersucht, indem man ein *in vitro* Proteinsynthesetzendes System verwendete, in dem das regelmäßige Kopolymere Poly AG als mRNA verwendet wurde. Normalerweise codiert Poly AGAG... nur Glutaminsäure und Arginin, aber in Anwesenheit von tRNA aus dem Suppressorstamm wurden auch Spuren von Glycin in die Polypeptide inkorporiert. Darüber hinaus entsprach die Menge von eingebautem Glycin gut der Häufigkeit der Suppression *in vivo*. Die Suppressor tRNA stimmt in der Chromatographie mit einem Teil der Glycin-tRNA überein; man vermutet deshalb, daß die Mutation wahrscheinlich eine Veränderung in einem Glycin-tRNA Anticodon mit sich bringt. Wenn das so ist, haben wir es wieder mit einem Fall zu tun, in dem das mutierte Gen normalerweise eine seltenere und keine der häufigeren tRNA-Spezies codiert. Gegen eine Veränderung in einer Hauptkomponente spricht die Tatsache, daß solch eine Veränderung sehr wahrscheinlich letal ausginge.

### **MUTATIONEN IN RIBOSOMEN BEEINTRÄCHTIGEN EBENFALLS DIE ABLESEGENAUIGKEIT**

Das Ausmaß der Nonsense- und auch der Missense-Suppression wird auch durch die genaue Struktur der Ribosomen bestimmt. Spezifische Mutationen

in mehreren der 30S Proteine beeinflussen die Ablesegenauigkeit. Jeder Austausch in einer Anzahl verschiedener Aminosäuren muß zu einer Verzerung der Struktur der Ribosomen führen, sodaß der gestörte Komplex aus Matrize und Ribosom nicht immer fähig ist, das richtige tRNA-Molekül auszuwählen (Abbildung 13-9). Eine solche Mutation, «ram» (*ribosomal ambiguity*; ribosomale Zweideutigkeit) führt bei vollständiger Abwesenheit irgendeiner Suppressor-tRNA zu einer schwachen Unterdrückung aller drei Nonsense-Codons.

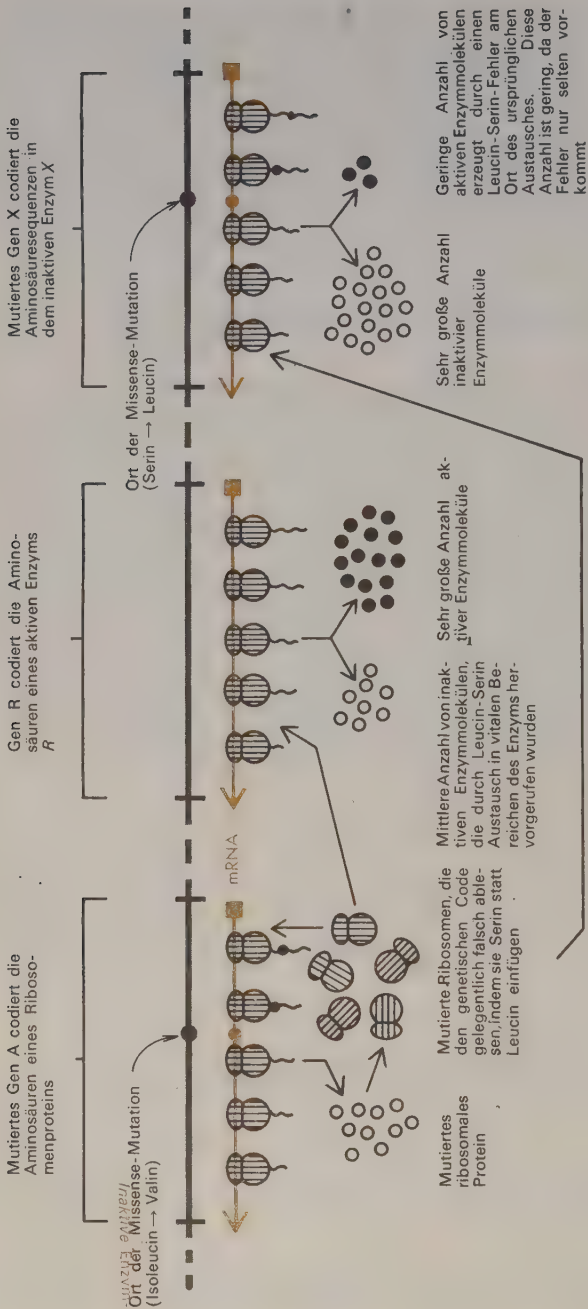
### STREPTOMYCIN VERURSACHT ABLESEFEHLER

Die Annahme, daß verzernte Ribosomen den genetischen Code falsch ablesen, wird besonders durch Versuche unterstützt, die zeigen, daß die Beigabe des Antibiotikums Streptomycin zu *in vitro* Systemen oder auch zu lebenden Zellen Fehler in der Übersetzung des genetischen Codes fördert. Streptomycin wirkt, indem es sich mit den Ribosomen verbindet und dabei die normalen Wechselwirkungen zwischen mRNA-tRNA und Ribosomen stört. Das Ausmaß der Ablesefehler hängt davon ab, ob das Streptomycin zu Streptomycin-sensitiven oder Streptomycin-resistenten Zellen gegeben wird. Die Beigabe des Antibiotikums zu sensitiven Zellen resultiert in einer großen Zahl von Ablesefehlern. Die Mutation zu Streptomycin-Resistenz verändert die Ribosomen so, daß Ablesefehler viel seltener auftreten. Sie sind dennoch häufig genug, um eine Anzahl von Mutationen zu unterdrücken, indem sie die Synthese einer geringen Anzahl von aktiven Enzymmolekülen veranlassen (Abbildung 13-10).

Es scheint heute, daß Streptomycin nicht wahllos Ablesefehler verursacht. Wenn Poly U mit sensitiven Ribosomen als Matrize verwendet wird, ist der häufigste Fehler der Austausch von Phenylalanin (UUU) durch Isoleucin (AUU). Dies deutet darauf hin, daß die Anwesenheit von Streptomycin normalerweise die Position nur eines der drei Nukleotide im (UUU) Codon stört (Abbildung 13-11).

### SUPPRESSORGENE LESEN AUCH INTAKTE GENE FALSCH

Wir sehen also, daß Suppressorgene nicht spezifisch mRNA-Matrizen, die auf mutierten Genen hergestellt wurden, falsch lesen. Tatsächlich beeinflussen sie im wesentlichen die Synthese aller Proteine. Die meisten Suppressorfehler treten daher beim Kopieren von intakten mRNA-Matrizen auf, was die Synthese von funktionsfähigen Proteinen hemmt. Diese Veränderungen sind im allgemeinen für die wachsende Zelle nicht sehr schädlich, da viel



**ABBILDUNG 13-9** Schematische Darstellung, die zeigt, wie eine Missense-Mutation in einem Gen, das ein der ribosomalen Proteine codiert, als Suppressor-Mutation wirkt.



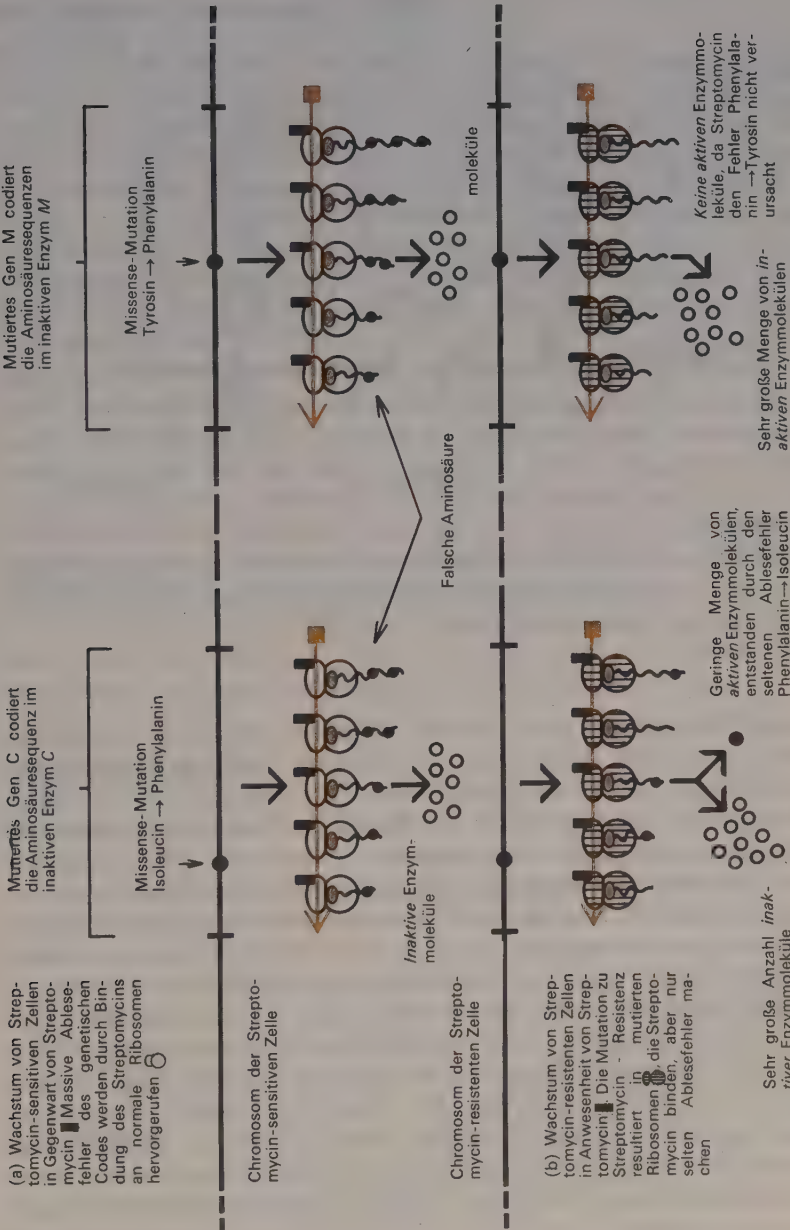
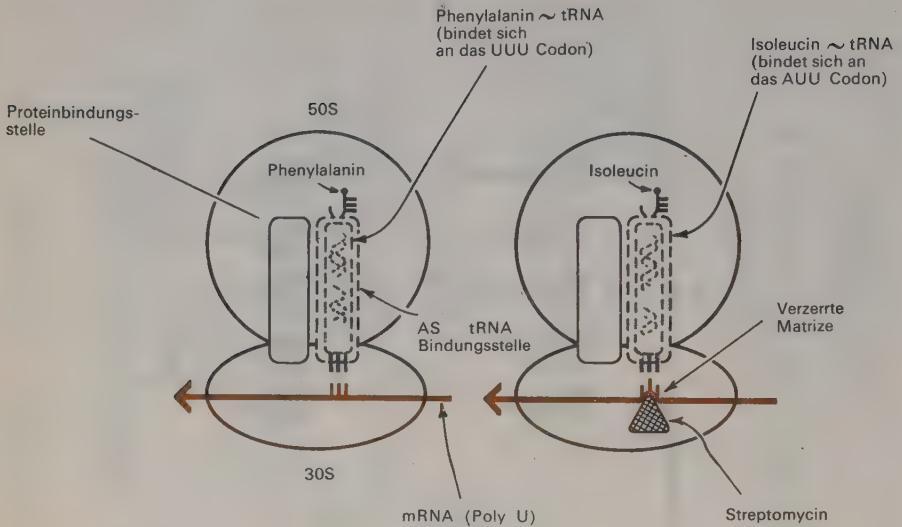


ABBILDUNG 13-10 Schematische Darstellung der Wirkung von Streptomycin auf Streptomycin-sensitve und Streptomycin-resistente *E. coli* Zellen.



**ABBILDUNG 13-11** Auswahl eines Isoleucin-tRNA-Moleküls durch einen Ribosom-Poly U-Streptomycin Komplex. Hier betrifft der durch Streptomycin veranlaßte Lesefehler ein Isoleucin ~ tRNA-Molekül, das sich normalerweise an das (AUU) Codon heftet.

mehr intakte Kopien, von jedem Protein hergestellt werden als fehlerhafte. Es besteht jedoch kein Vorteil für eine normale Zelle. Suppressormutationen zu enthalten, die sie veranlassen, einen auch nur geringen Teil fehlerhafter Proteine zu produzieren. In der Evolution besteht im allgemeinen ein Selektionsdruck gegen Suppressoren, außer wenn eine schädliche Mutation vorhanden ist, deren Wirkung sie kompensieren müssen.

Es ist jetzt möglich, eine genaue Voraussage über die normale Funktion der Suppressorgene zu machen. Ein Gen wird durch Mutation zu einem Suppressorgen. Bevor diese Mutation stattfindet, ist das Gen normal und aktiv, codiert entweder eine spezifische tRNA, eines der Proteine eines Ribosoms oder eines der Enzyme, die an der Proteinsynthese beteiligt sind. Es hat sich so entwickelt, daß sein Produkt die optimale Konfiguration für die genaue Ablesung des genetischen Codes hat. Wenn eine Mutation ein Gen so verändert, daß sein ebenfalls verändertes Produkt die Häufigkeit der Ablesefehler erhöht, wird dieses Gen ein Suppressorgen. Nur wenn eine erhöhte Fehlerhäufigkeit für die zelluläre Existenz notwendig ist, haben seine Mutantenprodukte einen selektiven Vorteil über ihre normalen Gegenstücke.

## DER CODE IST FÜR DIE MEISTEN, WENN NICHT SOGAR ALLE SPEZIES IDENTISCH

Poly U regt die Inkorporation von Phenylalanin in zellfreien Extrakten einer Vielfalt verschiedener Organismen, von Bakterien bis zu höheren Säugetieren, an. Ähnlich fördert Poly C die Inkorporation von Prolin und Poly A verursacht Lysin-Inkorporation in allen überprüften Extrakten, unabhängig von ihrer zellulären Herkunft. Solche Anzeichen der Universalität des Codes für alle derzeitig lebende Organismen läßt darauf schließen, daß der genetische Code während einer langen entwicklungsgeschichtlichen Periode unverändert geblieben ist. Aber solange nicht alle Codons in mehreren Organismen eindeutig bekannt sind, ist dieser Punkt weder rigoros bewiesen noch widerlegt. Man erwartet, daß der größte Teil des Codes unveränderlich ist. Man stelle sich vor, wozu eine Mutation, die den genetischen Code ändert, führen würde. Solch eine Mutation könnte zum Beispiel die Sequenz der Serin-spezifischen tRNA-Moleküle der Klasse, die auf (UCU) paßt, ändern und dabei veranlassen, daß sie sich statt dessen mit (UUU) Sequenzen verbinden. Dies wäre eine letale Mutation in haploiden Zellen, die für jede Art von tRNA nur ein Gen enthalten. Keine normale Serin-spezifische tRNA dieser Klasse könnte hergestellt werden und Serin würde an vielen seiner normalen Positionen nicht eingebaut. Sogar wenn es mehr als ein Gen für jede tRNA Art gäbe (z.B. in einer diploiden Zelle), wäre diese Art der Mutation noch immer letal, da sie gleichzeitig den Austausch vieler Phenylalaninreste durch Serin in den meisten Zellproteinen verursachen würde.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Der direkteste Weg, um den genetischen Code zu analysieren, ist die Proteinsynthese in zellfreien Extrakten zu untersuchen. Die nützlichsten in vitro Systeme verwenden Zellextrakte, aus denen die ursprüngliche Messenger-Komponente entfernt wurde. Die Beigabe neuer mRNA zu diesen Extrakten führt zu der Produktion neuer Proteine, deren Aminosäuresequenzen durch die von außen zugegebene mRNA bestimmt werden. Die Zugabe der Phagen F2-RNA zum Beispiel führt zu neuen Proteinen, die mit dem F2-Hüllprotein praktisch identisch sind. Daher wirkt das virale RNA-Gen als mRNA.*

*Der erste (und wahrscheinlich wichtigste) Schritt bei der Entzifferung des genetischen Codes fand statt, als man erkannte, daß das synthetische Polyribonukleotid Poly U Polyphenylalanin spezifisch codiert. Ein Codon für Phenylalanin ist somit (UUU). Die Verwendung von anderen synthetischen Polyribonukleotiden, homogen (Poly C, etc.) und gemischt (Poly AU, etc.) ergab eine Anzahl von versuchsweisen Codonzuordnungen für verschiedene Aminosäuren.*

Die eindeutige Bestimmung ergab sich aus dem Studium spezifischer Wechselwirkungen zwischen Trinukleotid-tRNA-Ribosom, und der Verwendung regelmäßiger Kopolymere als Boten. Alle 64 Codons wurden identifiziert. Einundsechzig stehen für spezifische Aminosäuren; die verbleibenden drei sind Stoppsignale. Der Code ist stark entartet; mehrere Codons entsprechen gewöhnlich einer einzigen Aminosäure. Eine bestimmte tRNA kann manchmal mehrere Codons spezifisch erkennen. Diese Zweideutigkeit ist auf den «Wobble» der Base am 5'-Ende des Anticodons zurückzuführen.

Das Codon für die beginnende Aminosäure, N-Formyl-methionin, ist AUG, dasselbe Codon wie für Methionin. Wie ein Codon beiden Zwecken dienen kann, ist unklar. Die Stoppcodons UAA, UAG und UGA werden durch spezifische Proteine, und nicht durch spezialisierte tRNA-Moleküle, erkannt. Es ist unbekannt, warum drei verschiedene Stoppcodons existieren müssen; neuere Sequenzanalysen von Nukleotiden zeigen jedoch, daß zumindest ein Gen mit zwei aufeinanderfolgenden Stoppcodons endet.

Gewisse Mutationen (intergene Suppressormutationen) scheinen die Fehlerhäufigkeit beim Lesen des genetischen Codes zu erhöhen. Infolge dieser Erhöhung der Fehlerhäufigkeit kann ein mutiertes Gen gelegentlich ein normales Produkt hervorrufen. Suppressorgene existieren sowohl für Missense- (Aminosäureaustausch) als auch für Nonsense- (Kettenabbruch) Codons. tRNAs mit veränderten Anticodons sind die molekulare Grundlage der Wirkungsweise vieler Suppressorgene.

Der genetische Code scheint im wesentlichen in allen Organismen gleich zu sein. Dies ist nicht überraschend. Variationen des genetischen Codes von Organismus zu Organismus würden bedeuten, daß sich der Code durch Mutationen entwickelt hat, und es ist fast unmöglich, sich eine Mutation vorzustellen, die die Buchstaben in einem Codon verändern könnte, ohne letal zu sein.

## LITERATUR

- Nirenberg, M. W., und J. H. Matthaei, «The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **47**, 1588 (1961). Die klassische Arbeit, die bewies, daß Poly U Polyphenylalanin codiert.
- Crick, F. H. C., «The Recent Excitement in the Coding Problem», *Prog. Nucleic Acid Res.*, **I**, 164, (1963). Eine hervorragende Analyse des Codierungsproblems, wie es sich Ende 1962 darstellte.
- Leder, P., und M. W. Nirenberg, «RNA Code Words and Protein Synthesis II: Nucleotide Sequence of a Valine RNA Code Word», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **52**, 420 (1964). Eine elegante Arbeit, die die Nukleotidanordnung innerhalb eines Codons für Valin festlegt.



- Nishimura, S., D. S. Jones und H. G. Khorana, «The *in Vitro* Synthesis of a Copolypeptide Containing Two Amino Acids in Alternating Sequence Dependent upon a DNA-like Polymer Containing Two Nucleotides in Alternating Sequence», *J. Mol. Biol.*, **13**, 302 (1965). Eine weitere klassische Arbeit über den genetischen Code. Hier findet man einen eindeutig Beweis dafür, daß jedes Codon drei Nukleotide enthält.
- Gorini, L., «Antibiotics and the Genetic Code». Ein Artikel in *Scientific American*, 1966, nachgedruckt in *The Molecular Basis of Life*, R. H. Haynes und P. C. Hanawalt (Eds.), Freeman, San Francisco, 1968.
- «The Genetic Code», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, (1966). Eine sehr eindrucksvolle Sammlung von Arbeiten, die im Juni 1966 vorgetragen wurden, kurz nachdem die allgemeinen Charakteristika des Codes klar wurden.
- Crick, F. H. C., «Codon-Anticodon Pairing: The Wobble Hypothesis», *J. Mol. Biol.*, **19**, 548 (1966). Ein wichtiger Diskussionsbeitrag, der zum Verständnis dafür führte, wie eine einzige tRNA-Spezies sich an mehr als ein Codon binden kann.
- Woese, C. R., *The Genetic Code*, Harper and Row, New York, 1967. Eine Zusammenfassung der gegenwärtig bekannten Daten, von historischen Gesichtspunkten aus gesehen.
- Garen, A., «Sense and Nonsense in the Genetic Code», *Science*, **160**, 149 (1968). Faßt den größten Teil dessen, was über die Wirkung der Suppressorgene bekannt ist, zusammen.
- Ycas, M., *The Biological Code*, Wiley (Interscience), New York, 1969. Die ausführlichste Monographie über den Code, geschrieben von einem der frühesten Forscher auf diesem Gebiet.
- Nichols, J. L., «Nucleotide Sequence from the Polypeptide Chain Termination Region of the Coat Protein Cistron in Bacteriophage R17», *Nature*, **225**, 147 (1970). Die erste Analyse von Stoppcodons *in vivo*.

# 14

## REGULATION DER SYNTHESE UND FUNKTION VON PROTEINEN

Nach der Darstellung der Grundzüge über die Beteiligung von Nukleinsäuremolekülen bei der Proteinsynthese können wir nun die Frage untersuchen, wie die Syntheserate der verschiedenen Proteinmoleküle kontrolliert wird. Eine bestimmte Zelle besitzt ganz unterschiedliche Mengen an verschiedenen Proteinen; es muß also Mittel und Wege geben, die selektive Synthese derjenigen Proteine sicherzustellen, die in großer Zahl benötigt werden. Bis vor kurzem war man an dieses Problem hauptsächlich mit Ignoranz, Spekulation und großen Hoffnungen herangegangen. Jetzt aber wissen wir, daß die Synthesegeschwindigkeit eines Proteins selbst auch wieder teils unter interner-genetischer Kontrolle steht und teils von der äußeren chemischen Umgebung bestimmt wird. Um zu zeigen, wie diese verschiedenen Faktoren einander beeinflussen können, wollen wir wieder die Bakteriensysteme betrachten, da sie bis jetzt die Grundlage für die meisten wichtigen Vorstellungen geliefert haben.

### NICHT ALLE PROTEINE WERDEN IN DER GLEICHEN MENGE SYNTHETISIERT

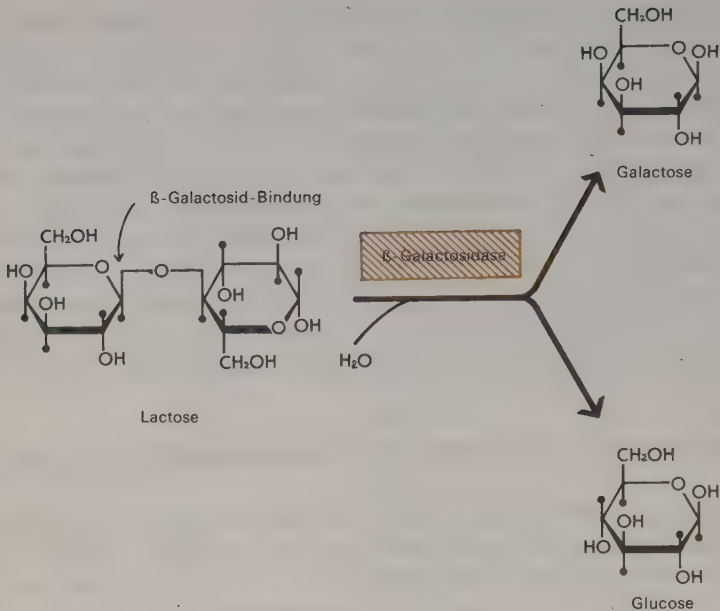
Ausgehend von der Länge des *E. coli* Chromosoms haben wir in früheren Kapiteln geschätzt, daß es 2000-4000 verschiedene Polypeptidketten codieren kann. Wieviele verschiedene Proteine gleichzeitig in einer gegebenen Zelle vorhanden sind, ist noch nicht bekannt. Schätzt man die Zahl von Enzymen ab, die wahrscheinlich für die Herstellung der verschiedenen

notwendigen Stoffwechselprodukte erforderlich sind, kommt man auf mindestens 600-800 verschiedene Enzyme in einer Zelle, die auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle wächst. Einige dieser Enzyme, besonders solche, die an den ersten Schritten des Glucoseabbaus und der Synthese der üblichen Aminosäuren und Nukleotide beteiligt sind, sind in relativ großen Mengen vorhanden. Zusätzlich braucht man auch noch größere Mengen derjenigen Enzyme, die für die Produktion der energiereichen Bindungen im ATP notwendig sind. Im Gegensatz dazu sind andere Enzyme, vor allem die, die für die Synthese der in geringen Mengen benötigten Coenzyme erforderlich sind, nur in Spuren vorhanden. Es muß außerdem noch relativ große Mengen der verschiedenen Strukturproteine geben, die für den Aufbau der Zellwand, der Zellmembran und der Ribosomen gebraucht werden.

#### UNTERSCHIEDE IN DEN MENGEN VERSCHIEDENER *E. COLI*-PROTEINE

Man kennt nur für wenige Proteine die genaue Zahl von Molekülen, die normalerweise in einer Bakterienzelle vorliegt. Am besten untersucht wurde das *E. coli* Enzym  $\beta$ -Galactosidase ( $MG = 5,4 \times 10^5$ ), das den Zucker Lactose in seine Glucose- und Galactoseuntereinheiten aufspaltet (Abbildung 14-1). Jedes aktive Molekül hat die Struktur eines Tetrameren und ist aus vier identischen Polypeptidketten, je vom Molekulargewicht 135.000, aufgebaut. Das Enzym ist besonders wichtig, da Lactose weder als Kohlenstoff noch als Energiequelle benützt werden kann, wenn sie nicht in die einfacheren Zucker Galactose und Glucose aufgespalten wird. *E. coli* Zellen, die auf Lactose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, enthalten im allgemeinen etwa  $3 \times 10^3$  Moleküle  $\beta$ -Galactosidase, was etwa 3% des gesamten Proteingehaltes entspricht. Das ist die maximale Menge, die überhaupt synthetisiert werden kann, wenn nur 1 Gen, das die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Galactosidase codiert, auf dem *E. coli* Chromosom vorhanden ist. Wenn das Gen in zwei Kopien vorliegt, können 6% des gesamten von der Zelle produzierten Proteins  $\beta$ -Galactosidase sein. Es gibt tatsächlich überproduzierende Mutantenstämme, die möglicherweise viele Kopien dieses Gens besitzen und bei denen fast 15% des Proteins  $\beta$ -Galactosidase sein können. Diese Überproduktion kann jedoch nur auf Kosten von anderen Proteinen erreicht werden. Zellen, die außergewöhnlich große Mengen von  $\beta$ -Galactosidase produzieren, wachsen schlecht und werden leicht durch andere Mutanten mit einer ausgeglichenen Proteinsynthese überwuchert.

Es gibt zusätzlich noch gute Daten über die Menge von ribosomalen Strukturproteinen. Man kennt ungefähr 55 solcher Proteine (durchschnittliches Molekulargewicht  $\sim 20.000$ ), die in rasch wachsenden Zellen zusammen etwa 10% der Gesamtproteinsynthese ausmachen. Das durchschnittliche



**ABBILDUNG 14-1** Der Zucker Lactose kann durch das Enzym Galactosidase hydrolytisch in Galactose und Glucose gespalten werden. Mutanten, die dieses Protein nicht synthetisieren können, sind unfähig, Lactose als Kohlenstoffquelle zu benutzen.

Ribosomenprotein stellt also etwa 0,2% des gesamten *E. coli* Proteins dar. Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, ähnliche quantitative Daten für die Enzyme zu erhalten, die für die Biosynthese der Coenzyme benötigt werden. In einigen Fällen erwarten wir, daß es nur sehr wenige Moleküle geben wird. Es dürfte jedoch schwierig sein, diese Annahme zu beweisen, da die Isolierung auch nur eines dieser Enzyme in Mengen, die für eine Molekulargewichtsbestimmung notwendig sind, sehr große Mengen an Zellen voraussetzt.

#### BEZIEHUNG ZWISCHEN MENGE EINES BESTIMMTEN PROTEINS UND BEDARF

Große Schwankungen in der Menge eines Proteins können abhängig davon auftreten, ob es gebraucht wird oder ob die Umweltsbedingungen seine Funktion überflüssig machen. So gibt es z.B. ungefähr 3000  $\beta$ -Galactosi-

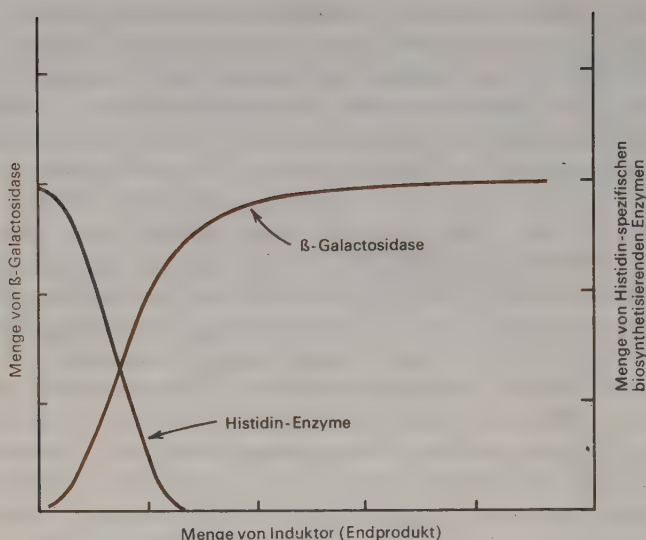


dasemoleküle in jeder normalen *E. coli* Zelle, die in Gegenwart von  $\beta$ -Galactosiden wie z.B. Lactose wächst, aber weniger als ein Tausendstel dieser Menge in Zellen, die auf anderen Kohlenstoffquellen wachsen. Substrate wie Lactose, deren Zusatz zu einem Wachstumsmedium die Menge eines Enzyms spezifisch erhöhen, nennt man «Induktoren»; die entsprechenden Enzyme werden induzierbare Enzyme genannt. Ein völlig anderes Verhalten zeigen viele Enzyme, die an der zellulären Biosynthese beteiligt sind. So enthalten z.B. *E. coli* Zellen, die auf einem Medium ohne Aminosäuren wachsen, alle Enzyme, die für die Biosynthese der 20 notwendigen Aminosäuren gebraucht werden. Wenn andererseits das Wachstumsmedium diese Aminosäuren enthält, so fehlen die entsprechenden an der Biosynthese beteiligten Enzyme fast völlig. Enzyme, deren Menge in Gegenwart des Endproduktes reduziert ist, (z.B. ist Histidin das Endprodukt des Histidin-biosynthetisierenden Enzyms) nennt man repressible Enzyme. Die Stoffwechselendprodukte, deren Zugabe zu einem Wachstumsmedium die Menge eines bestimmten Enzyms herabsetzen, nennt man Korepressoren. Induktions- und Repressorreaktionen sind für ein Bakterium gleich nützlich: wenn Enzyme gebraucht werden, um ein bestimmtes Nährstoffmolekül umzuwandeln oder einen notwendigen Zellbestandteil zu synthetisieren, sind sie vorhanden; wenn sie nicht gebraucht werden, fehlen sie praktisch völlig.

Die Adaptation ist jedoch keine alles-oder-nichts Reaktion, da unter Bedingungen, bei denen ein mittlerer Bedarf besteht, auch mittlere Mengen von Enzym vorhanden sein können (Abbildung 14-2). Ähnliche Schwankungen unterliegen auch die Mengen von Strukturproteinen. Das sieht man am besten an der Schwankung in der Anzahl der Ribosomen selbst. Wenn Bakterien mit maximaler Geschwindigkeit wachsen, machen die Ribosomen 25-30% der Zellmasse aus. Wenn die Wachstumsgeschwindigkeit jedoch infolge eines ungünstigen Nährstoffangebotes sinkt, brauchen die Bakterien weniger Ribosomen, um die geringere Proteinsyntheserate aufrecht zu erhalten; der Ribosomengehalt kann dann bis auf 20% des Maximalwertes absinken.

### **SCHWANKUNGEN IN DER PROTEINMENGE KÖNNEN DIE ANZAHL SPEZIFISCHER mRNA-MOLEKÜLE WIDERSPIEGELN**

In sich aktiv teilenden Bakterien sind die meisten Proteinmoleküle, die einmal synthetisiert worden sind, recht stabil. Die Schwankungen in der Menge eines Proteins reflektieren daher seine Synthesegeschwindigkeit und nicht seine relative Stabilität. Die Schwankungen in der Synthesegeschwindigkeit stehen ihrerseits wieder in Beziehung zum Unterschied in der zur Verfügung stehenden Anzahl von mRNA-Matrizen. Die Zahl der  $\beta$ -Galactosidase Ma-



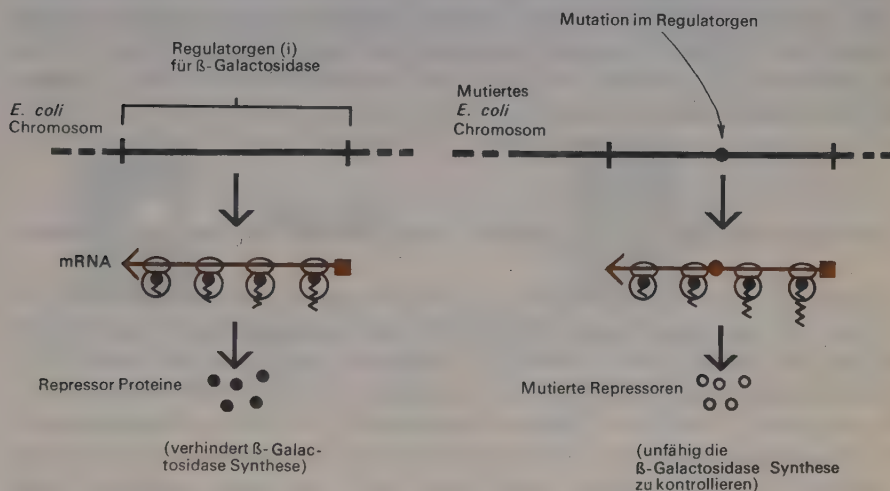
**ABBILDUNG 14-2** Schwankungen in der Enzymmenge pro Zelle, die von der Induktor (Endprodukt)-Menge im Wachstumsmedium abhängen.

trizen in einer Zelle, die aktiv  $\beta$ -Galactosidase synthetisiert, überschreitet z.B. bei weitem die Zahl, die man in Zellen findet, die dieses Enzym gerade nicht synthetisieren. Der beste Schätzwert zur Zeit ist, daß während maximaler  $\beta$ -Galactosidase Synthese in jeder Zelle 35 bis 50  $\beta$ -Galactosidase-mRNA-Moleküle vorhanden sind. Wenn hingegen Lactose fehlt, enthält die durchschnittliche Zelle weniger als ein Molekül der für  $\beta$ -Galactosidase spezifischen mRNA.

## REPRESSOREN KONTROLLIEREN DIE SYNTHESERATE VIELER mRNA SPEZIES

Eine besondere Klasse von Molekülen, die als Repressoren bezeichnet werden, entscheidet, wann mRNA-Moleküle, die induzierbare und repressible Enzyme codieren, gemacht werden. Jeder Repressor blockiert die Synthese eines oder mehrerer Proteine; wie alle anderen Proteine, werden auch Repressoren durch chromosomale DNA codiert. Die Gene, die sie codieren, werden Regulatorgene genannt. Man hat eine Reihe von mutierten Regulatorgenen isoliert, die nicht mehr in der Lage sind, einen funktionstüchtigen Repressor

zu codieren. Zellen die inaktive Regulatorgene enthalten, synthetisieren die betreffenden Proteine unabhängig vom Bedarf (Abbildung 14-3). Solche Mutanten werden konstitutive Mutanten genannt. Proteine, die unabhängig vom Bedarf in gleichbleibenden Mengen produziert werden, nennt man konstitutive Proteine.



**ABBILDUNG 14-3** Die Kontrolle von Repressoren durch normale und mutierte Gene.

Einige Mutationen in Regulatorgenen können durch Suppressormutationen in anderen Genen unterdrückt werden. Das heißt, die Anwesenheit eines Suppressorgens kann die Synthese funktionstüchtiger Repressoren wieder herstellen. Diese Beobachtung legt nahe, daß Fehler beim Ablesen der mRNA Botschaft die Struktur des Repressors verändern; daraus schloß man wiederum, daß einige oder vielleicht alle Repressoren Proteinmoleküle sind.

## REPRESSOREN SIND PROTEINE

Der Proteincharakter von Repressoren wurde kürzlich durch die Isolierung zweier verschiedener Repressoren bestätigt. Einer davon kontrolliert die Synthese der *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase, der andere die Synthese  $\lambda$ -Phagen-spezi-

fischer Proteine, wenn das  $\lambda$ -Chromosom als Prophage in das *E. coli* Chromosom integriert ist (siehe Kapitel 15). Der  $\beta$ -Galactosidase-Repressor ist bis jetzt der am besten charakterisierte. Seine Grundeinheit, eine Polypeptidkette vom Molekulargewicht 40.000, aggregiert zu Tetrameren mit einem Molekulargewicht von 160.000. Das Tetramere scheint die aktive Form darzustellen; gewöhnlich gibt es nur 10-20 Kopien davon für jedes *E. coli* Chromosom. Diese äußerst geringe Zahl machte ihre ursprüngliche Entdeckung und Isolierung zu einer bemerkenswerten Leistung. Man kennt nun glücklicherweise Mutationen (siehe unten), die zu wesentlich größeren Mengen führen ( $>1\%$  des gesamten Zellproteins), wodurch die Isolierung ausreichender Mengen für die Aminosäuresequenzanalyse ermöglicht wurde. Die komplette Sequenz sollte im Laufe des nächsten Jahres (1971) bekannt sein.

### REPRESSOREN WIRKEN DADURCH, DASS SIE SICH AN DIE DNA BINDEN

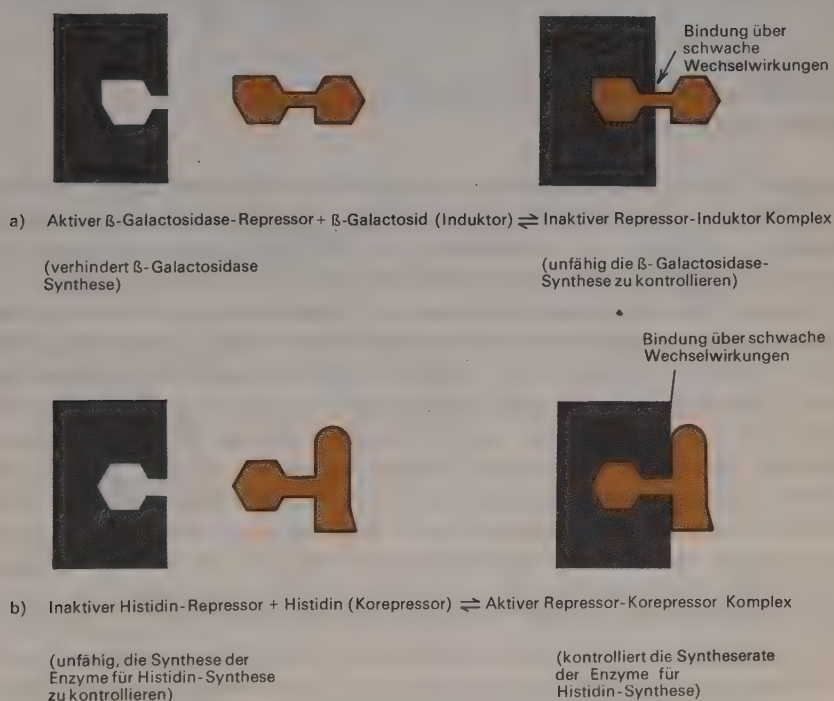
Sowohl die  $\beta$ -Galactosidase wie die  $\lambda$ -Repressoren binden an spezifische Stellen auf ihren zugehörigen DNA-Molekülen, wodurch die Transkription der entsprechenden mRNA-Moleküle verhindert wird. Die spezifischen Nukleotidsequenzen, an die die Repressoren binden, werden Operatoren genannt. Im allgemeinen muß ein Operator mindestens 10-12 Basen umfassen, um mit den geeigneten Wasserstoffbrücken bildenden Gruppen eines Repressors reagieren zu können. Diese relativ große Zahl von Basen verhindert, daß zufällig eine ähnliche Sequenz irgendwo auf dem gleichen Chromosom vorliegt. Falls eine kleinere Zahl ausreichen würde, könnte es zu einer zu großen Zahl falscher Bindungen kommen. Eine größere Zahl spezifischer Wechselwirkungen hat die zusätzliche Folge, daß die Bindung sehr fest sein kann. Wenn ein aktiver  $\beta$ -Galactosidase-Repressor einmal an die DNA gebunden ist, bleibt seine Bindung so lange wirksam, bis er mit seinem Induktor reagiert.

### KOREPRESSOREN UND INDUKTOREN BESTIMMEN DEN FUNKTIONELLEN ZUSTAND DER REPRESSOREN

Repressoren dürfen nicht ständig in der Lage sein, die spezifische mRNA-Synthese zu verhindern. Wenn sie das könnten, würden sie für immer die Synthese ihres zugehörigen spezifischen Proteins verhindern. Statt dessen können alle Repressormoleküle sowohl in einer aktiven wie einer inaktiven Form vorliegen, je nachdem ob sie mit ihrem entsprechenden Induktor (Korepressor) verbunden sind. Die Bindung des Induktors inaktiviert den Repressor. So kann z.B. der  $\beta$ -Galactosidase-Repressor in Verbindung mit



einem  $\beta$ -Galactosid<sup>1</sup> (Induktor) sich nicht an seinen spezifischen Operator binden. Die Zugabe von  $\beta$ -Galactosiden zu wachsenden Zellen ermöglicht daher die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase, indem sie die Konzentration von aktiven  $\beta$ -Galactosidase-Repressoren herabsetzt. Im Gegensatz dazu wandelt die Bindung eines Korepressors einen inaktiven Repressor in die aktive Form um. So aktiviert z.B. die Zugabe von Aminosäure zu Zellen Repressoren, die die Synthese von Enzymen kontrollieren, welche an der Biosynthese der Aminosäuren beteiligt sind. Das führt zu einem raschen Abschalten der Synthese spezifischer mRNA-Moleküle (Abbildung 14-4).



**ABBILDUNG 14-4** Schematische Darstellung der entgegengesetzten Effekte von Korepressor und Induktor auf die Aktivität von Repressoren. Wir sehen hier, daß, je nachdem ob das Enzym induzierbar oder repressibel ist, der freie Repressor entweder aktiv oder inaktiv ist.

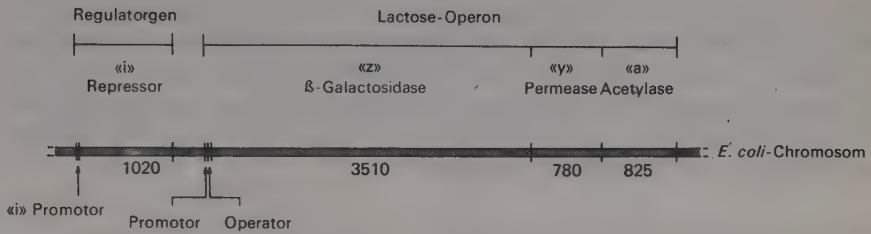
<sup>1</sup> Es wird jetzt vermutet, daß Lactose selbst nicht der wahre Induktor der  $\beta$ -Galactosidase-Synthese ist. Statt dessen wird angenommen, daß Lactose zuerst in eine verwandte Verbindung übergeführt wird, die sich dann an den Repressor bindet.

Zwischen Repressoren und ihren zugehörigen Induktormolekülen oder Korepressoren werden keine kovalenten Bindungen gebildet. Statt dessen besitzt jedes Repressormolekül einen Bereich, der eine komplementäre Struktur für einen bestimmten Teil seines Induktors (Korepressors) darstellt. Schwache sekundäre Wechselwirkungen (Wasserstoff-Brückenbindungen, ionische Bindungen oder van der Waals-Kräfte) können sich dann zwischen Repressor und Induktor (Korepressor) ausbilden. Da diese alle schwache Bindungen sind, können sie rasch gebildet und gelöst werden, wodurch sich der Zustand des Repressors (aktiv oder inaktiv) schnell dem physiologischen Bedürfnis der Zelle anpassen kann. Die Synthese der  $\beta$ -Galactosidase-mRNA hört z.B. fast unmittelbar nach Entfernung der Lactose auf.

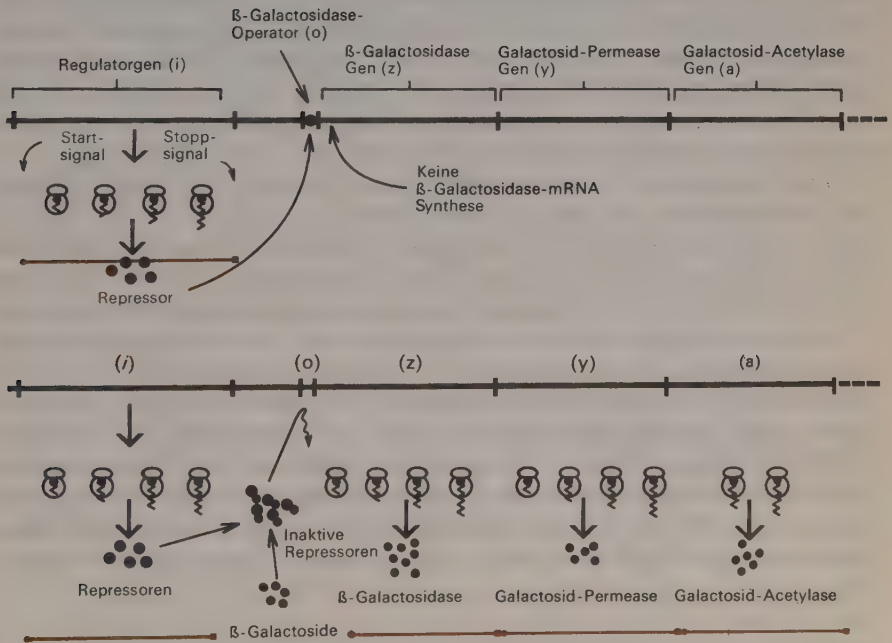
#### REPRESSOREN KÖNNEN MEHR ALS EIN PROTEIN KONTROLLIEREN

In einigen Fällen können Repressoren nur die Synthese eines Proteins kontrollieren. Häufig wird jedoch die Synthese mehrerer Enzyme durch einen einzigen Repressor beeinflusst. So kontrolliert z.B. der  $\beta$ -Galactosidase-Repressor aus *E. coli* mindestens drei Enzyme: die  $\beta$ -Galactosidase selbst; die Galactosid-Permease, die die Geschwindigkeit des Einstromens der  $\beta$ -Galactoside in die Bakterien reguliert; und die Galactosid-Acetylase, deren Funktion noch unbekannt ist. Wenn aktive  $\beta$ -Galactosid-Permease fehlt, können die *E. coli* Zellen  $\beta$ -Galactoside nicht intrazellulär konzentrieren. Da  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Galactosid-Permease und Galactosid-Acetylase (?) normalerweise notwendig sind, um  $\beta$ -Galactoside zu metabolisieren, ist ihre koordinierte Synthese offensichtlich wünschenswert. Eine koordinierte Synthese wird dadurch erreicht, daß die entsprechenden Enzyme durch benachbarte Gene codiert werden (Abbildung 14-5), wodurch es möglich ist, daß ein einziges mRNA-Molekül die genetische Information für alle betroffenen Enzymmoleküle enthält (Abbildung 14-6). Durch den Repressor der Aminosäure Histidin wird sogar eine noch größere Zahl von Genen (10) koordiniert reprimiert. Das wird ebenfalls dadurch erreicht, daß ein einziges mRNA-Molekül die Information all dieser Gene trägt.

Die Gesamtheit benachbarter Nukleotide, die ein einziges mRNA-Molekül codieren (unter der Kontrolle eines einzigen Promotors; siehe unten), nennt man Operon. Einige Operons enthalten daher ein Gen, andere zwei und wieder andere mehrere Gene. Zuerst nahm man an, daß Repressoren spezifisch für einzelne Operons wären. Vor ein paar Jahren fand man jedoch einen Fall, der am leichtesten unter der Annahme zu interpretieren ist, daß ein spezifischer Repressor auf drei verschiedene Operons wirken kann: die Gene, die für die Biosynthese von Arginin in *E. coli* verantwortlich



**ABBILDUNG 14-5** Das Lactose-Operon und seine assoziierten Regulatorgene sind maßstabgetreu wiedergegeben, entsprechend der bekannten Größe ihrer Genprodukte. Die Zahlen geben die Anzahl von Basenpaaren an, die man in den einzelnen Genen findet. Der genaue Abstand zwischen dem Regulatorgen und dem Lactose-Operon ist jedoch noch unbekannt. Möglicherweise sind sie nur durch wenige Nukleotide voneinander getrennt.



**ABBILDUNG 14-6** Wie Wechselwirkungen zwischen Repressor, Induktor und Operator die Synthese der *E. coli* Proteine  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Galactosid-Permease und Galactosid-Acetylase kontrollieren.

sind, wurden auf drei ungekoppelte Operons verteilt gefunden. Trotzdem gibt es Hinweise dafür, daß ein Regulatorgen die Menge der Enzyme, die zu all den Operons gehören, kontrolliert. Ganz ähnlich kann auch der  $\lambda$ -Repressor an mehr als einer Stelle wirksam sein. Er bindet spezifisch an zwei Operatorgene, von denen eines zur linken und eines zur rechten des entsprechenden Regulatorgens liegt.

### **DAS FEHLEN EINES OPERATORGENS FÜHRT ZU KONSTITUTIVER SYNTHESE**

Operatorgene (Repressor-Bindungsstellen) liegen alle den Regionen sehr nahe, an denen die Transkription der mRNA beginnt. Tatsächlich sind sie so eng verbunden, daß ursprünglich der Verdacht bestand, daß die Operatorregion mit den Nukleotiden überlappt, die für die ersten paar Aminosäuren in der  $\beta$ -Galactosidase codieren. Es gibt jedoch jetzt feste Beweise gegen eine Überlappung.

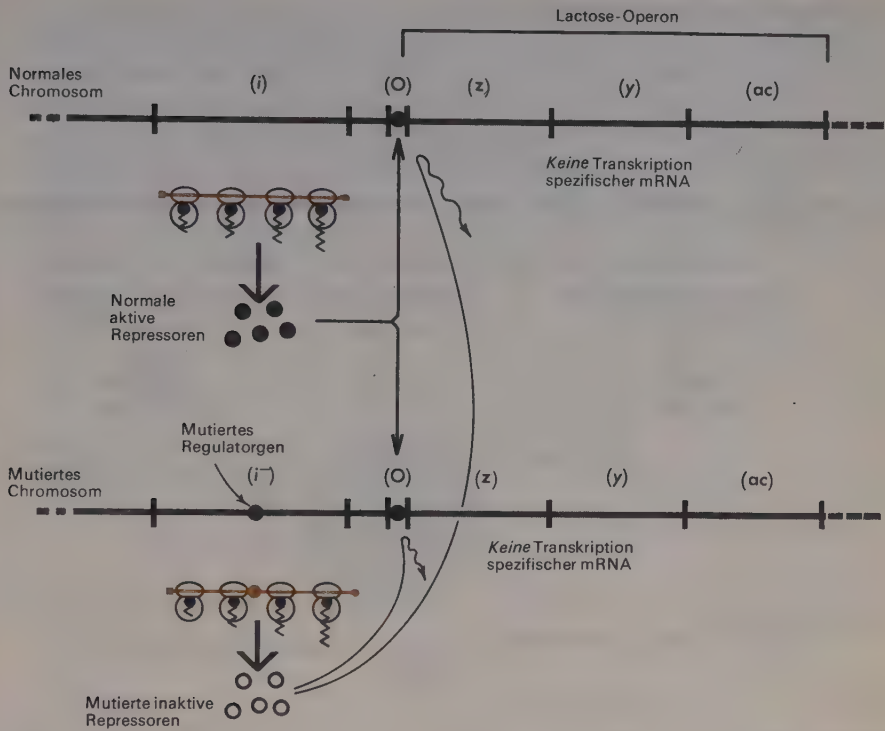
Die Anwesenheit von gebundenem Repressor verhindert nur die Initiation von mRNA und hat keinen Effekt auf das Kettenwachstum, wenn die Elongation schon begonnen hat. Operatorgene haben somit im wesentlichen eine negative Funktion: wenn ein funktionsfähiger Operator fehlt, kann der entsprechende Repressor die Synthese der spezifischen mRNA nicht hemmen; das Ergebnis ist die konstitutive Synthese des korrespondierenden Proteinprodukts (oder der Produkte).

Das Vorhandensein von Operatoren wurde zuerst durch genetische Analyse nachgewiesen. Die Struktur eines Operators kann zu einer inaktiven Form mutieren, wodurch der Repressor wirkungslos gemacht wird. Wenn das passiert, kommt es zu konstitutiver Enzymsynthese. Diese Mutanten werden deshalb O (konstitutiv-«constitutive» auf englisch)-Mutanten genannt. O<sup>-</sup> Mutationen können leicht von Mutationen im Repressorgen unterschieden werden, wenn man die Enzymsynthese in speziellen teilweise diploiden Zellen mißt, die zwei Kopien der betreffenden Chromosomenregion enthalten. Zellen, die ein nichtfunktionelles und ein funktionelles Repressorgen enthalten, können immer noch reprimiert werden, da gute Repressormoleküle auf beide Operatoren wirken können (Abbildung 14-7). Im Gegensatz dazu werden Zellen, die nur einen schlechten Operator enthalten, immer konstitutiv sein, egal in welchem Zustand das Repressorgen ist (Abbildung 14-8).

### **mRNA-SYNTHESE BEGINNT IN DER NÄHE DES PROMOTORS**

Die Regionen auf einem DNA-Molekül, an die sich RNA-Polymerasemoleküle spezifisch binden, heißen Promotorstellen (Abbildung 14-9). Die Exi-

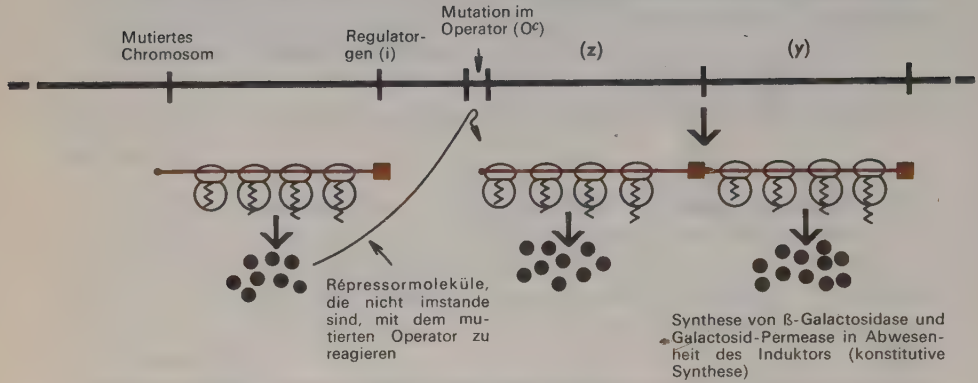




**ABBILDUNG 14-7** Verwendung teilweise diploider Zellen für den Nachweis, daß die Anwesenheit funktioneller Repressoren über die Anwesenheit inaktiver Repressoren dominant ist. In Abwesenheit exogener  $\beta$ -Galaktoside werden keine nennenswerten Mengen von  $\beta$ -Galaktosidase-Molekülen in diesen Zellen produziert.

stanz von Promotorstellen wurde durch die Isolierung von Mutanten bekannt, die das  $\beta$ -Galaktosidase-Operon mit wesentlich geringerer Effizienz transkribierten, und zwar auch dann, wenn der zugehörige Repressor völlig fehlte oder auch in Gegenwart von konstitutiven Operatormutationen (Abbildung 14-10). Nicht alle Promotormutationen reduzieren notwendigerweise die spezifische Bindung der RNA-Polymerase. Man kennt Fälle, in denen die Bindungswirksamkeit durch eine Mutation im Promotor sogar erhöht wird. Das Promotorkonzept wird durch Ergebnisse von *in vitro* Versuchen mit RNA-Polymerase wesentlich gestützt.  $\lambda$ -Phagen-DNA mit spezifischen Promotormutationen ist untauglich für die Herstellung bestimmter RNA-Moleküle, die mit Hilfe von DNA-Molekülen mit normalen Promotoren synthetisiert werden.

a) Haploide Zelle, die ein mutiertes Operatorgen ( $O^c$ ) enthält



b) Teilweise diploide Zelle, die einen normalen Operator (O) und einen mutierten ( $O^c$ ) Operator enthält. In diesem Fall ist  $O^c$  dominant über O

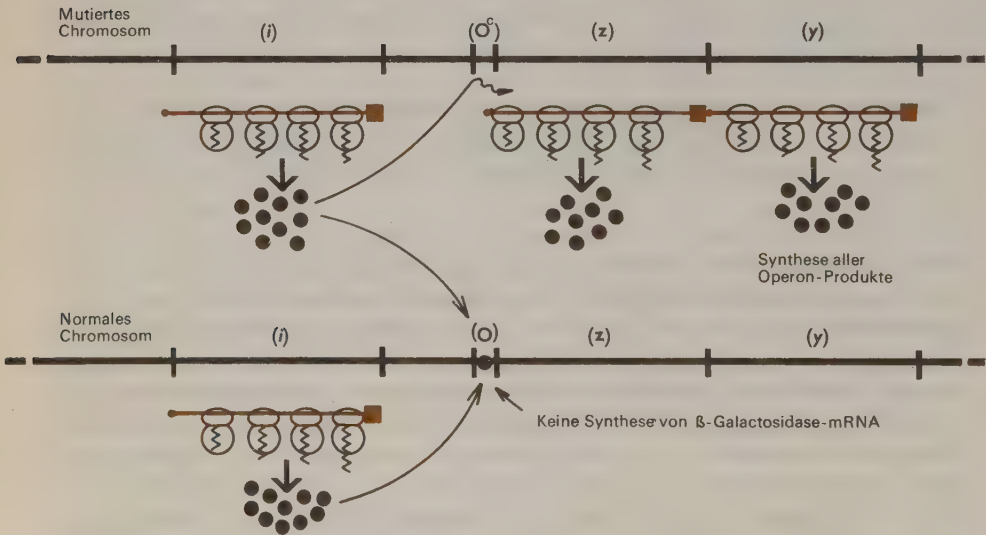


ABBILDUNG 14-8 Die Kontrolle spezifischer mRNA-Synthese durch normale und mutierte Operatorgene.

A priori gibt es keinen Grund, warum ein Promotor und sein zugehöriger Operator sich nicht einige gemeinsame Nukleotide teilen sollten. Eines oder alle der Nukleotide, die durch einen spezifischen Repressor erkannt werden, könnten sich mit einigen Nukleotiden, die den Promotor bilden, überlappen. Beim  $\beta$ -Galactosidase-Operon kann man jedoch mit genetischen Mitteln keine Überlappung nachweisen. In diesem Fall liegt der Operator zwischen dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen und dem Promotor. Bei anderen Operons gibt es jedoch keinen Grund, warum der Promotor seinem korrespondierenden Gen nicht unmittelbar benachbart sein sollte.

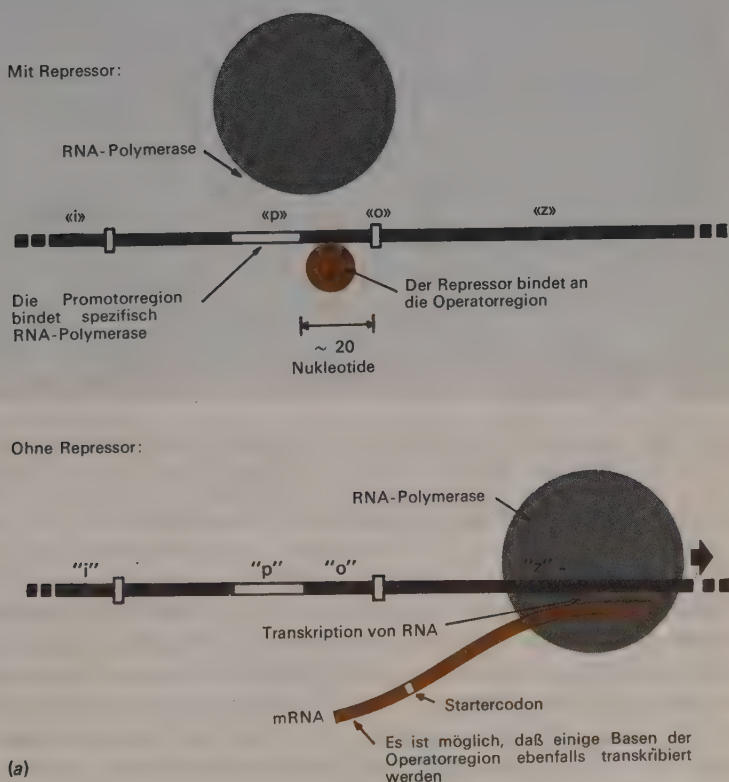
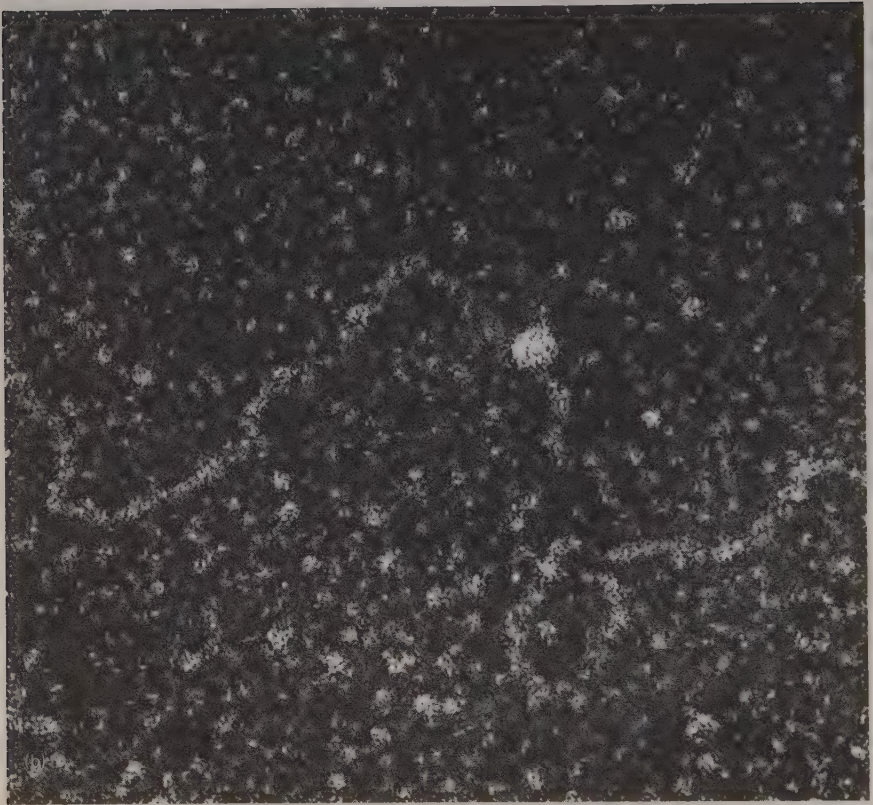


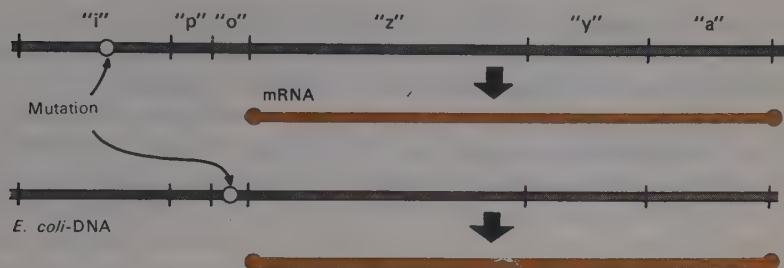
ABBILDUNG 14-9 a) Bindung von RNA-Polymerase an den Promotor für das Lactose-Operon.



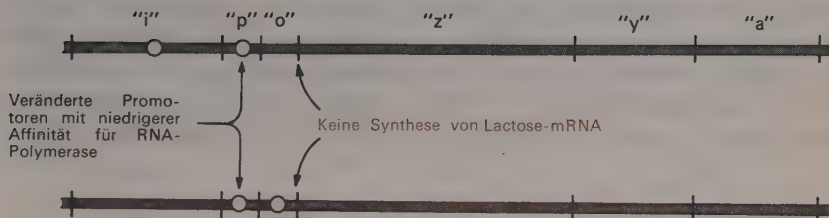
**ABBILDUNG 14-9** (fortgesetzt). b) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines  $\beta$ -Galactosidase (Lactose)-Repressors, der spezifisch an den Promotor für das Lactose-Operon gebunden ist. (Aufnahme freundlicherweise von Jack Griffiths, Cornell University, Physics Department zur Verfügung gestellt.)

Bevor diese genetischen Ergebnisse bekannt waren, wurde allgemein angenommen, daß nur die Nukleotidsequenzen transkribiert werden, die Aminosäuren entsprechen. Es besteht jetzt aber die Möglichkeit, daß, zumindest in einigen Fällen, der Operator selbst transkribiert wird. Das ist jedoch kein zwingender Schluß, denn da die RNA-Polymerase zu den größten bekannten Proteinen gehört, kann die Stelle, an die sie sich bindet (der Promotor) 10-20 Nukleotide (30-60 Å) von dem Basenpaar entfernt sein, das für die Anfangsnukleotide der mRNA codiert (Abbildung 14-9). Auf alle Fälle zeigen kürzlich vorgenommene Nukleotidsequenzanalysen, daß viele mRNA-Ketten nicht mit einem der beiden Initiierungscodons (AUG und GUG) beginnen.





a) In Abwesenheit eines aktiven Repressors oder mit einem mutierten Operator, erlaubt der Wildtyp-Promotor die Synthese großer Mengen von lac-mRNA



b) Eine Promotormutation, die jegliche Synthese von lac mRNA verhindert, sogar in Abwesenheit eines aktiven Repressors oder eines inaktiven Operators

ABBILDUNG 14-10 Genetischer Nachweis des Promotors für das Lactose-Operon.

## UNGLEICHE PRODUKTION VON PROTEINEN, DIE DURCH EIN EINZIGES mRNA-MOLEKÜL CODIERT WERDEN

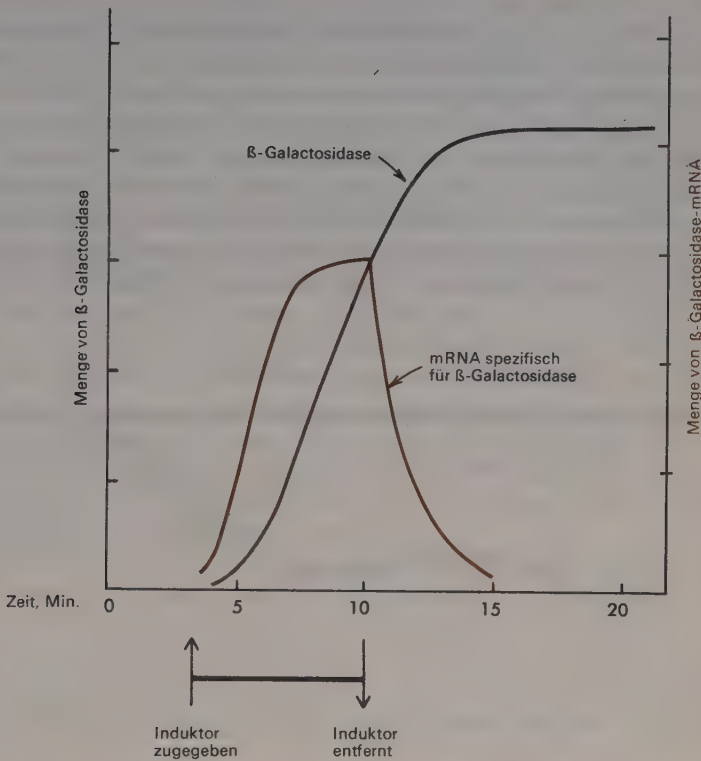
Unterschiede in der Zahl von Molekülen verschiedener Proteine können auch daher kommen, daß die Proteine, die von einem einzigen mRNA-Molekül codiert werden, nicht in gleichen Zahlen synthetisiert zu werden brauchen. Diese Tatsache wird durch Untersuchung der Proteine des Lactose-Operons illustriert: es werden viel mehr Kopien von  $\beta$ -Galactosidase synthetisiert als von Galactosid-Permease oder Galactosid-Acetylase. Das Verhältnis, in dem die drei Produkte auftreten, ist 1:1/2:1/5. Das kann bedeuten, daß die Ribosomen sich mit verschiedenen Geschwindigkeiten an die verschiedenen Startpunkte entlang einer gegebenen mRNA binden, je nach der Nukleotidstartsequenz. Andererseits könnte sein, daß die Ribosomen nur

an das  $\beta$ -Galactosidasegen binden, wobei die Translation der nachfolgenden Gene davon abhängig wäre, wie häufig Ribosomen abspringen, nachdem das Kettenterminationssignal abgelesen ist. Diese Hypothese paßt gut zu der Beobachtung, daß das  $\beta$ -Galactosidasegen am häufigsten abgelesen wird und das Acetylasegen am seltensten. Ein anderer Faktor, von dem man sich vorstellen könnte, daß er die Translation beeinflusst, ist das Vorkommen von Codons, deren entsprechende tRNA-Spezies nur in sehr geringen, limitierenden Mengen vorhanden ist. Hypothetisch könnten Ribosomen an solchen Codons stecken bleiben und darauf warten müssen, daß die limitierende tRNA bis zu ihnen diffundiert. Man muß jedoch betonen, daß es bisher keinen Beweis für solche tRNA-Spezies gibt. Auf jeden Fall ist es vernünftig anzunehmen, daß es Mechanismen gibt, die eine unterschiedliche Ablesegeschwindigkeit entlang eines mRNA-Moleküls erlauben. Obwohl das koordinierte Auftreten von Enzymen, die zueinander in Beziehung stehen, für eine Zelle offensichtlich von großem Vorteil ist, besteht kein Grund, auch gleiche Zahlen von Molekülen zu produzieren. Eine gleiche Anzahl wäre nur dann sinnvoll, wenn die spezifischen katalytischen Umsatzraten (turnover) zusammengehöriger Proteine gleich wären. Im allgemeinen bestehen jedoch große Unterschiede in den individuellen Umsatzraten.

#### BAKTERIELLE mRNA IST HÄUFIG METABOLISCH INSTABIL

Wenn Korepressor-(Induktor)-Moleküle wachsenden Bakterienkulturen zugesetzt oder aus dem Medium entfernt werden, verändert sich sehr schnell die Synthesegeschwindigkeit der entsprechenden Proteine. Diese rasche Anpassung an eine wechselnde Umgebung ist nicht nur möglich, weil Wachstum eine kontinuierliche Synthese neuer mRNA-Moleküle voraussetzt, sondern, noch wichtiger, weil viele bakterielle mRNA-Moleküle metabolisch instabil sind. Die durchschnittliche Lebensdauer vieler *E. coli* mRNA-Moleküle bei 37° C beträgt etwa 2 Minuten. Nach dieser Zeit werden sie enzymatisch abgebaut. Die freien Nukleotide, die dabei entstehen, werden zu den energiereichen Triphosphaten phosphoryliert und erneut bei der Synthese neuer mRNA-Moleküle verwendet.

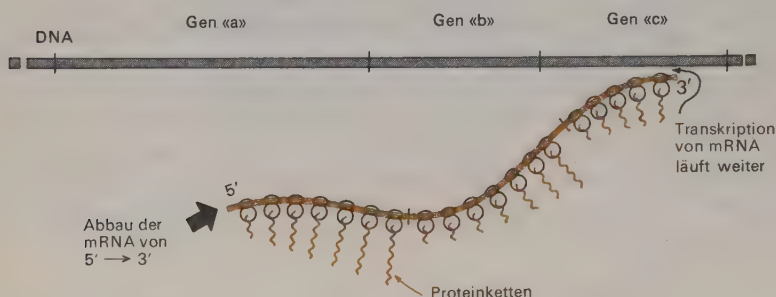
Die Matrizen für Proteine werden tatsächlich alle paar Minuten vollständig durch neue ersetzt. So synthetisiert z.B. innerhalb weniger Minuten nach Zugabe geeigneter  $\beta$ -Galactoside die *E. coli* Zelle  $\beta$ -Galactosidase mit der maximalen Geschwindigkeit, die bei der entsprechenden Induktor-Konzentration überhaupt möglich ist. Wenn hingegen alle mRNA-Moleküle metabolisch stabil wären, könnte die maximale Synthesegeschwindigkeit erst erreicht werden, wenn durch das Zellwachstum vorher gemachte mRNA-Moleküle erfolgreich ausverdünnung sind. Entsprechend bedeutet die Existenz



**ABBILDUNG 14-11** *Rasche Zunahme (Abnahme) der  $\beta$ -Galactosidase-mRNA nach Zugabe (Entfernung) von  $\beta$ -Galactosidase-Induktoren. Die *E. coli* Zellen wurden in diesem Versuch bei 37°C unter Bedingungen gehalten, bei denen sich die Zellen alle 40 Minuten teilen.*

instabiler Lactose-mRNA aber auch, daß die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase, sobald die  $\beta$ -Galactoside entfernt werden, rasch zu einem Ende kommt und nicht wieder beginnt bevor es nicht erneut notwendig wird (Abbildung 14-11). Man nimmt jetzt an, daß die durchschnittliche Lebensdauer verschiedener mRNA-Spezies sehr unterschiedlich ist. Falls das stimmen sollte, bedeutet es, daß die Lebensdauer der mRNA selbst auch wieder genetisch bestimmt ist. Das heißt, die Nukleotidsequenz (vielleicht an einem Ende) eines mRNA-Moleküls bestimmt, mit welcher Wahrscheinlichkeit es enzymatisch abgebaut wird. Die Enzym-Mechanismen, durch welche die einzelnen mRNA-Moleküle abgebaut werden, konnten bis jetzt noch nicht

aufgeklärt werden. Man weiß jedoch, daß der Abbau von 5' nach 3' erfolgt (Abbildung 14-12a und b). Das Ende, das zuerst gemacht wird, wird auch zuerst abgebaut. Ein Abbau dieser Art wird also nicht zur Synthese unvollständiger Proteinketten führen. Wenn hingegen der Abbau von 3' nach 5' erfolgte, würden die Enden vieler Messenger-Moleküle zerstört werden, bevor die Ribosomen diese Sequenzen übersetzt hätten. Es gibt Hinweise dafür, daß mRNA-Moleküle stabil sind, solange sie an Ribosomen gebunden sind. Wenn die 5'-Enden von mRNA-Molekülen ihre Bewegung über Ribosomen beendigen, haben sie vielleicht die Wahl zwischen erneuter Bindung an Ribosomen oder aber einer Bindung an abbauende Enzyme, die sie zerstören.



**ABBILDUNG 14-12** Abbau einer mRNA von 5' nach 3'. Der Abbau eines langen mRNA-Moleküls beginnt häufig am 5'-Ende, sogar noch bevor das 3'-Ende synthetisiert wurde.

## PROTEINE, DIE NICHT UNTER DIREKTER KONTROLLE DURCH DIE UMGEBUNG STEHEN

Es gibt viele verschiedene Proteine in einer Zelle, deren Konzentration nicht durch die äußere Umgebung beeinflusst zu sein scheint. Z.B. verändert sich in *E. coli* die Menge der Enzyme, die den Abbau von Glucose kontrollieren nicht drastisch, wenn Glucose aus dem Wachstumsmedium entfernt oder ihm zugesetzt wird. Die Glucose-abbauenden Enzyme scheinen daher konstitutive Enzyme zu sein, deren Syntheserate weder von Induktoren noch von Korepressoren kontrolliert wird. Der Grund dafür ist noch unklar, denn eine Zelle, die die Menge dieser Enzyme nach Bedarf ändern kann, sollte eigentlich einen selektiven Vorteil haben. Man kann natürlich nicht ausschließen, daß weitere Experimente doch noch einen Induktor oder einen Korepressor nachweisen werden. Andererseits scheint der Augenblick gekommen zu sein, die allgemeinere Frage zu stellen: müssen alle Gene unter



einer Repressor-Operator Kontrolle stehen oder ist es möglich, die Menge von Proteinen auf andere Weise zu kontrollieren?

Die Antwort ist eindeutig. Die konstitutive Synthese irgend eines Enzyms in großen oder kleinen Mengen kann man sich leicht vorstellen. Eine konstitutive Synthese von großen Mengen ist das, was man beobachtet, wenn eine Mutation zum Verlust eines Repressors oder Operators führt. Die resultierende konstante Synthese des entsprechenden Proteins läuft mit der gleichen Geschwindigkeit wie unter optimalen Induktions- oder Repressionsbedingungen ab. Daraus sieht man, daß Repressorgene und Operatorgene per se für die Synthese von mRNA-Molekülen nicht benötigt werden.

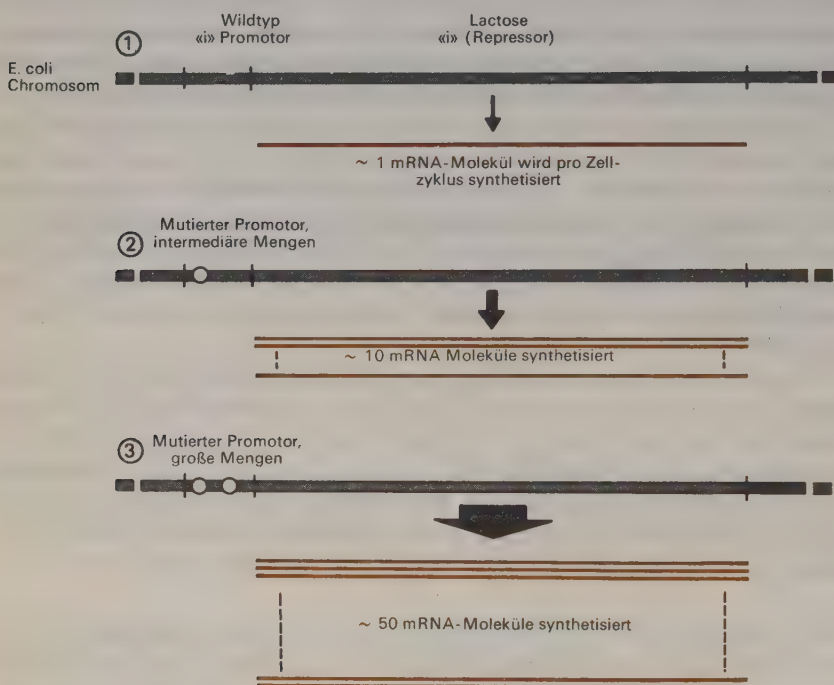
Im allgemeinen ist die Menge eines Produkts, das bei konstitutiver Synthese gemacht wird, von vier Faktoren abhängig: 1) der Geschwindigkeit, mit der ein spezifisches mRNA-Molekül in Abwesenheit von Repressoren oder Operator (-en) gemacht werden kann (man weiß heute, daß das eine Funktion der Promotorsequenz ist); 2) der Geschwindigkeit, mit der Ribosomen sich an den Initiierungspunkt der mRNA-Matrize binden; 3) der Geschwindigkeit, mit der die Botschaft selbst abgelesen wird, und 4) der Lebensdauer der betreffenden Matrize.

Leider ist es schwierig, die absolute oder auch nur die relative Bedeutung dieser Faktoren abzuschätzen, da wir noch so wenig über die Faktoren wissen, die die verschiedenen Geschwindigkeiten der jeweiligen Vorgänge kontrollieren. Die Erkenntnis, daß so viele Faktoren die Geschwindigkeit der konstitutiven Synthese steuern, weist jedoch darauf hin, daß die Synthese der vielen Proteine, die nur in geringer Menge gebraucht werden, ohne Beteiligung von Repressoren oder Operatoren reguliert werden kann.

#### **DIE SYNTHESE VON REPRESSOREN STEHT IM ALLGEMEINEN UNTER DER KONTROLLE DES PROMOTORS, NICHT UNTER DER DES OPERATORS**

Zu jedem gegebenen Zeitpunkt gibt es nur etwa 1000 mRNA-Moleküle in einer einzelnen *E. coli* Zelle. Die Abschätzung der minimalen Zahl von Operons, die durch Korepressoren (Induktoren) beeinflußt werden, liefert einen Wert von 100-200. Man kann sich deshalb schwer vorstellen, daß mehr als 1 oder 2 spezifische mRNA-Moleküle für jeden Repressor vorliegen. Eine größere Zahl von mRNA-Molekülen, die für Repressoren codieren (regulierende mRNA) würde die Menge von mRNA, die für notwendige Strukturproteine und Enzymproteine codiert, ernstlich einschränken. Wir schließen daraus, daß die Synthese der regulierenden mRNA wahrscheinlich sorgfältig kontrolliert wird. Das kann jedoch nicht durch eine völlig neue Gruppe von Repressoren geschehen, da sonst eine unendliche Zahl verschiedener Repressoren benötigt würde, die gegenseitig ihre Synthese kontrollieren. Daher muß ein Repressor entweder seine eigene Synthese reprimieren können

oder Repressoren werden konstitutiv synthetisiert. Die letztere Erklärung gilt für das  $\beta$ -Galactosidase-System, in dem bereits viele Promotormutationen kartiert wurden. Einige dieser Mutationen erhöhen die Menge an Repressor bis auf das 50fache der in Wildtyp-Zellen gefundenen Werte (Abbildung 14-13).



**ABBILDUNG 14-13** Zunahme der Zahl von Lactose-Repressor-mRNA-Molekülen infolge von Promotormutationen. Man nimmt an, daß der Promotor, der zur Synthese großer Mengen führt, durch mehrere zusätzliche Mutationsereignisse entsteht.

## DIE FRAGE DER POSITIVEN KONTROLLE

Die Rolle, die Repressormoleküle bei der Hemmung der mRNA-Synthese spielen, ist ein Beispiel für eine negative Kontrolle, da in der Abwesenheit der kontrollierenden Faktoren die Synthese rascher abläuft als in ihrer Gegenwart. Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, daß es auch Stoffwechselvorgänge gibt, die positiv und nicht negativ kontrolliert werden. Das Arabinose-Operon ist dafür ein klassisches Studienobjekt. Seine mRNA codiert drei Proteine,

die an der Umwandlung der Arabinose in leichter abbaubare Stoffwechselprodukte beteiligt sind (Abbildung 14-14). Ohne Arabinose sind alle diese Enzyme in geringen Mengen vorhanden; wenn jedoch Arabinose zu den wachsenden Zellen zugesetzt wird, steigt die Menge aller drei Enzyme koordiniert an. Diese Induktion wird durch ein viertes Gen, das «C»-Gen, das den drei anderen unmittelbar benachbart ist, kontrolliert. Das Genprodukt des «C»-Gens scheint aber kein Repressor zu sein, da in seiner Abwesenheit keine Induktion eintritt. Weitere genetische Analysen haben gezeigt, daß «C» eine positive Rolle spielen muß. Da innerhalb des «C»-Gens Nonsense-Mutationen stattfinden, muß es ein Proteinprodukt liefern. Das schließt die Möglichkeit aus, daß «C» nicht ein Gen, sondern nur der Promotor ist, an dem die mRNA-Synthese des Arabinose-Operons beginnt. Alle Bemühungen, das «C»-Genprodukt zu isolieren, sind bisher fehlgeschlagen.

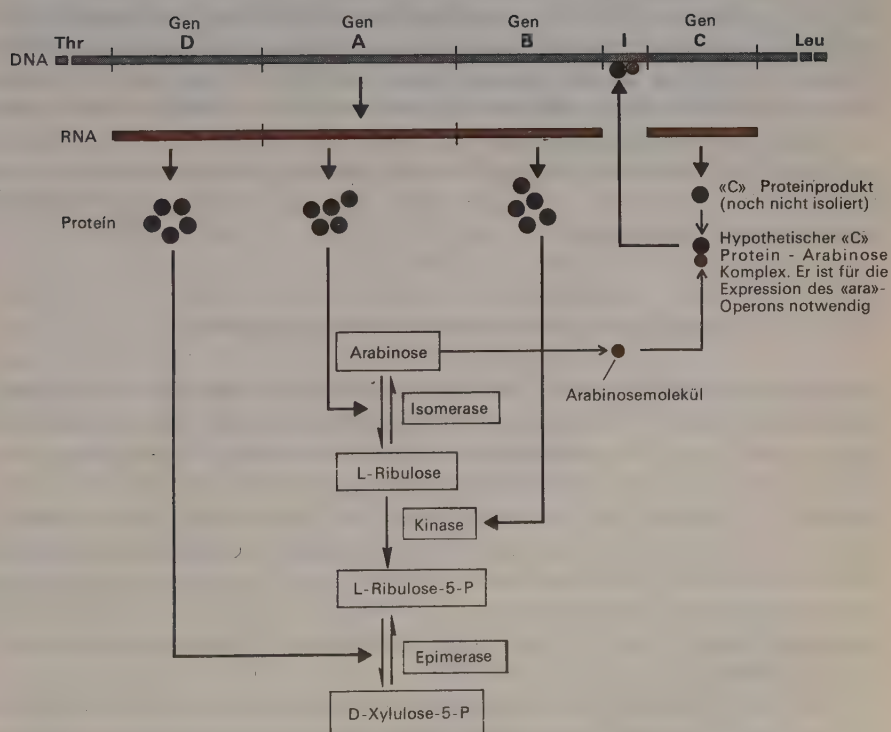


ABBILDUNG 14-14 Das Arabinose-Operon von *E. coli*: ein Beispiel für positive Kontrolle.

## SPEZIFISCHE $\sigma$ -FAKTOREN KÖNNEN GRÖßERE GRUPPEN VON NICHT MITEINANDER IN BEZIEHUNG STEHENDEN GENEN ANSCHALTEN

Bei der Diskussion der Wirkungsweise der RNA-Polymerase wurde betont, daß der dissoziierbare  $\sigma$ -Faktor und nicht das RNA-Polymerase-Core-Protein Startsignale (Promotoren) erkennt. Niemand weiß, wieviele verschiedene Startsignale mit spezifischen Nukleotidsequenzen in *E. coli* vorhanden sind. Man weiß auch nicht (falls es mehrere gibt) ob alle von  $\sigma$ -Faktoren mit identischer Struktur erkannt werden können. Man könnte sich vorstellen, daß während des Zellwachstums und der Zellteilung nach und nach verschiedene  $\sigma$ 's für kurze Zeit auftauchen und einen spezifischen Satz von Genen anschalten. Diese würden dann wieder durch  $\sigma$ 's mit anderer Spezifität ersetzt werden, die die Transkription wieder neuer Gene beginnen könnten. Es besteht noch die interessante Möglichkeit, daß an der rRNA- und tRNA-Synthese andere  $\sigma$ -Faktoren als an der mRNA-Synthese beteiligt sind. Man könnte dadurch jene Fälle einfach erklären, bei denen die rRNA- und tRNA-Synthese fast aufhört, während die mRNA-Synthese unverändert bleibt. Diese Beobachtungen könnten natürlich letzten Endes durch ein Repressor-Operator-Kontrollsystem erklärt werden. Wir werden aber in den nächsten Kapiteln sehen, daß das Verdrängen eines  $\sigma$ -Faktors durch einen anderen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des korrekten sequentiellen Auftretens einiger virusspezifischer Enzyme spielt. Es gibt sogar Hinweise, daß  $\sigma$ -Faktoren eine große Rolle bei der Embryonalentwicklung höherer Organismen spielen.

## DIE EXISTENZ EINES GLUCOSE-SENSITIVEN OPERONS

Die Funktion einiger Operons, von denen jedes den Abbau eines bestimmten Zuckers kontrolliert, ist praktisch völlig blockiert, wenn *E. coli* Zellen in Anwesenheit von Glucose wachsen. Wenn *E. coli* z.B. in Gegenwart von Glucose und Lactose gezüchtet wird, wird nur die Glucose verwendet; keines der Proteine des Lactose-Operons wird synthetisiert. Ganz ähnlich ist das Galaktose-Operon inaktiv, wenn Glucose und Galaktose vorhanden sind. Dieses Phänomen beschränkt sich nicht auf Operons mit negativen Kontrollsystemen. Die Arabinose- und Maltose-Operons, die beide unter positiver Kontrolle stehen, sind in Anwesenheit von Glucose ebenfalls nicht funktionsfähig.

Über den Grund für den gegenüber den anderen Zuckern so bevorzugten Abbau von Glucose kann man im Augenblick nur spekulieren. Am wahrscheinlichsten ist, daß dieser Weg energetisch begünstigt ist, was die Tatsache widerspiegelt, daß Bakterien sich häufiger in einer Umgebung



befinden, die reich an Glucose ist als in einer, die reich an anderen Zuckern ist.

Glucose-Inhibition wirkt nicht durch Beeinflussung der Geschwindigkeit, mit der verschiedene Zucker in die Zelle gelangen. Der Effekt setzt statt dessen auf der Ebene der RNA-Transkription ein. Darauf weist das Vorkommen einer Promotormutation hin, die das Lactose-Operon gegen die Wirkung von Glucose unempfindlich macht. In solchen Mutanten kann das Lactose-Operon sogar in Gegenwart großer Mengen von Glucose maximal induziert werden.

### DER GLUCOSEKATABOLISMUS BEEINFLUSST DIE MENGE VON ZYKLISCHEM AMP

Glucose wirkt nicht direkt auf die Transkription. Statt dessen kontrolliert eines seiner Abbauprodukte (Katabolit) die Menge an zyklischem AMP (Abbildung 14-15). Dieses wichtige Abbauprodukt ist für die Transkription aller Operons, die durch den Glucoseabbau kontrolliert werden, notwendig (Kataboliten-sensitive Operons). Die Wirkungsweise des zyklischen AMP wird gerade erst aufgeklärt. Man nimmt jetzt an, daß ein spezifischer Proteinfaktor und zyklisches AMP anwesend sein müssen, damit die Kataboliten-sensitiven Promotoren durch RNA-Polymerase erkannt werden können. Man wird wohl in absehbarer Zeit wissen, ob dieses Protein ein spezifischer  $\sigma$ -Faktor ist.

Es ist nicht bekannt, auf welche Weise das Glucose-Abbauprodukt die Menge an zyklischem AMP in der Zelle kontrolliert. ATP ist der unmittelbare metabolische Vorläufer von zyklischem AMP (Abbildung 14-15); das Enzym, das für die Umwandlung verantwortlich ist, Adenylcyclase (Abbildung 14-15), kann direkt durch ein spezifisches Abbauprodukt gehemmt werden. Andererseits könnte die Hemmung auch durch die Geschwindigkeit kontrolliert werden, mit der zyklisches AMP abgebaut wird, da ein Enzym existiert, das spezifisch zyklisches AMP in AMP umwandelt. Hoffentlich wird der richtige Mechanismus bald aufgeklärt sein.

### REGULATION DER PROTEINFUNKTION DURCH RÜCKKOPPLUNGSHemmung

Die katalytische Aktivität vieler Proteine wird durch ihre Bindung an spezifische kleine Moleküle beeinflusst. Wenn sie nicht gebraucht werden, kann die Aktivität von Enzymen auf diese Weise blockiert werden. Man betrachte z.B. was passiert, wenn *E. coli* Zellen, die auf einem Glucose-Mangelmedium wachsen, plötzlich die Aminosäure Isoleucin zugesetzt bekommen. Die Synthese (Funktion?) der mRNA-Moleküle, die die spezifischen, an der Isoleu-

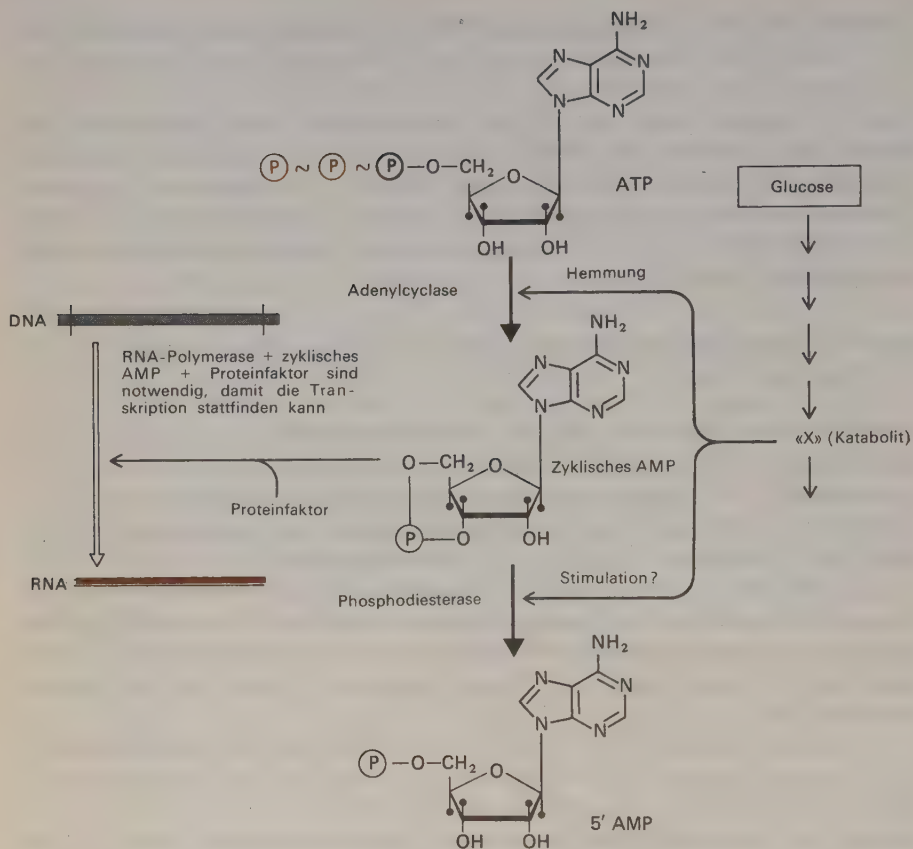
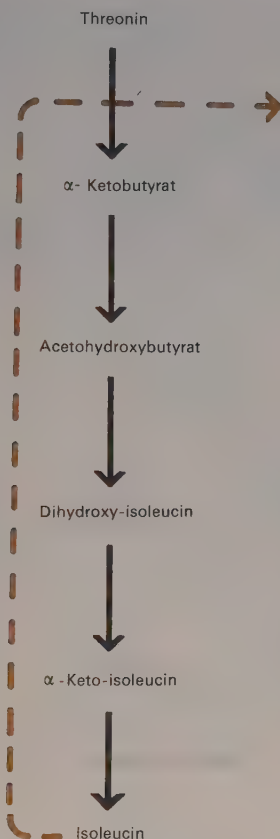


ABBILDUNG 14-15 Kontrolle der Kataboliten-sensitiven Transkription durch zyklisches AMP.

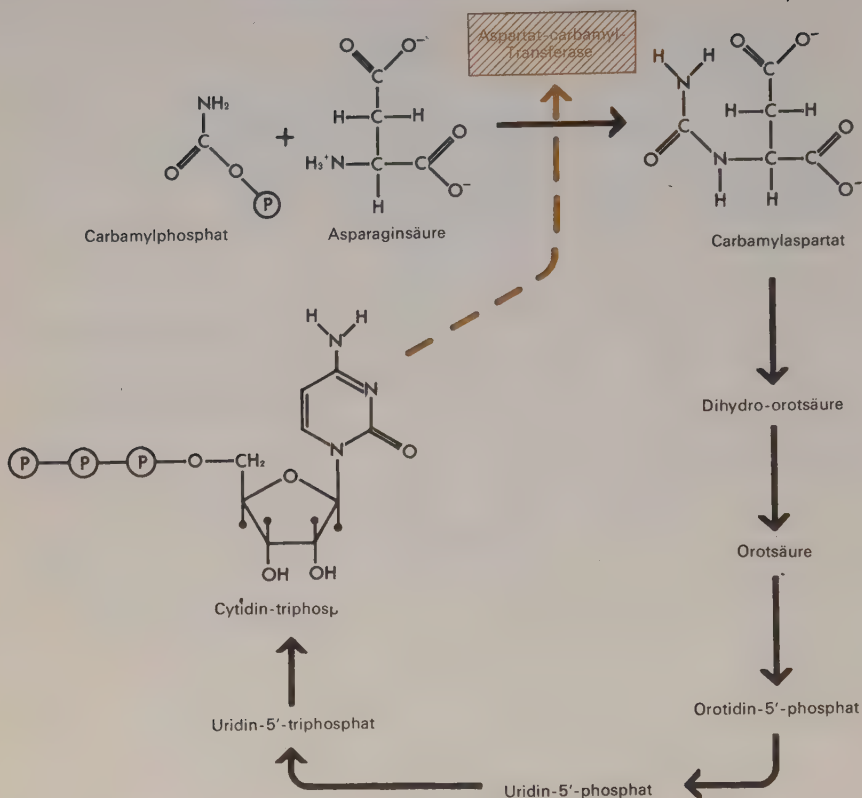
cin-Biosynthese beteiligten Enzyme codieren, hört sofort auf. Ohne zusätzlichen Kontrollmechanismus würden die bereits existierenden Enzyme zur weiteren Produktion von Isoleucin führen die aber jetzt wegen der Zufuhr von außen überflüssig ist. Es kommt jedoch fast nie zur überflüssigen Synthese, da hohe Konzentrationen von Isoleucin die Aktivität desjenigen Enzyms hemmen, das am ersten Schritt der Biosynthese, ausgehend von Threonin, beteiligt ist (Abbildung 14-16). Die Hemmung ist auf die Bindung von Isoleucin an das Enzym Threonin-Desaminase zurückzuführen, wodurch das Enzym außerstande ist, Threonin in  $\alpha$ -Ketobutyrat umzuwandeln. Da es zwischen dem Enzym und Isoleucin nur zu einer schwachen und reversiblen Bindung kommt, muß die Konzentration an Isoleucin relativ hoch



**ABBILDUNG 14-16** Der Biosynthese-Weg des Isoleucins, ausgehend von Threonin. Die gestrichelte farbige Linie zeigt an, daß Isoleucin das Enzym, das Threonin in  $\alpha$ -Ketobutyrat umwandelt (Threonin-Desaminase), hemmt.

sein, bevor die meisten Enzymmoleküle inaktiviert sind. Diese hochspezifische Hemmung wird als «feedback-Inhibition» (Rückkopplungs- bzw. Endprodukt-Hemmung) bezeichnet, da die Ansammlung des Produkts seine weitere Bildung verhindert. Durch die Verhinderung des ersten metabolischen Schrittes unterbleibt die Anhäufung unerwünschter Zwischenprodukte, wodurch sich die Hemmung der anderen Enzyme erübrigt.

Der letzte enzymatische Schritt bei der Synthese eines Endprodukts, das als Endprodukt-Inhibitor fungiert, ist oft durch mehrere Zwischenschritte vom Substrat (oder vom Produkt) des Enzyms entfernt, das an der ersten Stufe seiner Biosynthese beteiligt ist (Abbildung 14-17). Die Struktur des

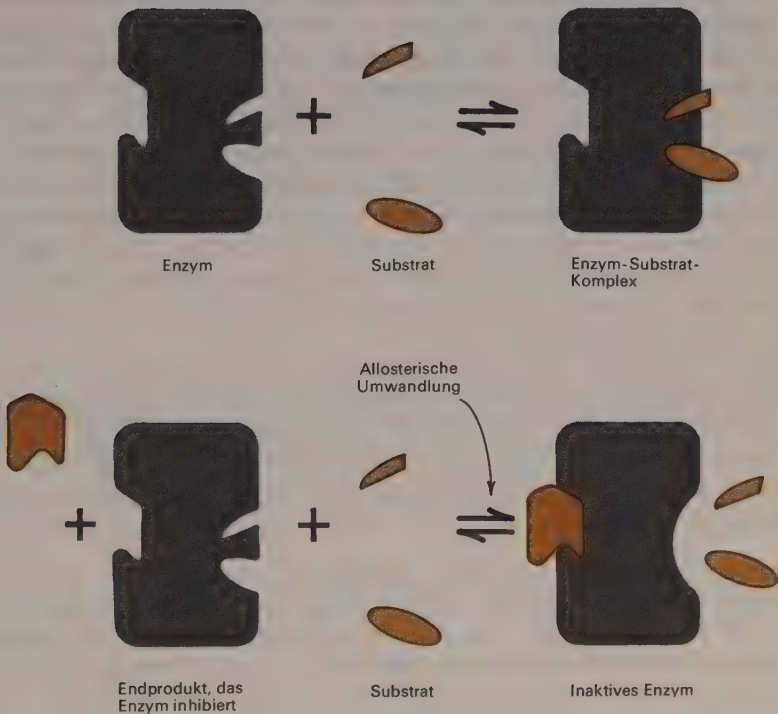


**ABBILDUNG 14-17** Schematische Darstellung, die zeigt, wie die Biosynthese der Pyrimidine in *E. coli* durch Endprodukt-Hemmung kontrolliert wird.

Inhibitors braucht somit nicht immer dem Substrat des gehemmten Enzyms zu gleichen, man würde daher auch nicht erwarten, daß der Endprodukt-Inhibitor mit dem enzymatisch aktiven Zentrum (der Region, die das Substrat bindet) desjenigen Enzyms reagiert, das durch ihn inaktiviert wird. Vielmehr besteht der Verdacht, daß das Endprodukt in manchen Fällen reversibel mit einer zweiten Region des Enzyms reagiert, aber trotzdem in der Lage ist, die Enzymaktivität zu blockieren. Möglicherweise kommt es dabei zu einer Änderung in der exakten Gestalt des Enzyms (allosterische Umwandlung), wodurch das Enzym verhindert wird, mit seinem Substrat zu reagieren (Abbildung 14-18). Proteine, deren Gestalt durch Bindung eines spezifischen kleinen Moleküls an einer anderen Stelle als dem aktiven Zentrum verändert



wird, nennt man allosterische Proteine; entsprechend werden die kleinen Moleküle, die die allosterische Umwandlung hervorrufen, als allosterische Effektoren bezeichnet. Es gibt bis jetzt nur sehr dürftige Daten über die chemischen Kräfte, die spezifische Endprodukt-Hemmstoffe an Proteine binden. Wie bei der postulierten Repressor-Korepressor-Bindung, nimmt man auch hier an, daß die Bindung auf schwachen sekundären Kräften beruht (Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen und van der Waals-Kräfte) und nicht auf kovalenten Bindungen. Die Endprodukt-Hemmung wird daher rasch aufgehoben, sobald die Konzentration des Endprodukts wieder geringe Werte erreicht.



**ABBILDUNG 14-18** Schematische Darstellung, die zeigt, wie die Bindung eines Endprodukt-Hemmstoffes ein Enzym inhibiert, indem es zu einer allosterischen Umwandlung führt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Zellen verfügen über Kontrollmechanismen, die garantieren, daß Proteine in den erforderlichen Mengen hergestellt werden. Erst seit kurzem haben wir begonnen, die molekularen Grundlagen der Kontrollmechanismen zu verstehen. Der größte Teil unserer Kenntnisse beschränkt sich auf die Bakterienzelle, besonders *E. coli*. Bakterien enthalten viele Enzyme, deren Synthesegeschwindigkeit davon abhängt, ob bestimmte Nährstoffmoleküle von außen der Zelle zur Verfügung gestellt werden. Diese von außen zugegebenen Moleküle (Korepressoren oder Induktoren) kontrollieren die Geschwindigkeit der Proteinsynthese durch Kontrolle der Synthese spezifischer mRNA-Matrizen. Korepressoren (Induktoren) wirken, indem sie sich an spezifische Moleküle, die Repressoren binden. Repressoren befinden sich im aktiven Zustand, wenn sie mit einem Korepressor verbunden sind, und im inaktiven Zustand, wenn sie sich mit einem Induktor verbunden haben. Aktive Repressoren wirken durch ihre Verbindung mit spezifischen Regionen der DNA (Operatorgene). Diese Bindung verhindert dann die spezifische Bindung der RNA-Polymerase an die Bindungsstelle auf der DNA (ihren Promotor) und blockiert dadurch spezifisch die Produktion von aufeinanderfolgenden Enzymen in der Synthese einer Aminosäure oder eines Nukleotids). Ein bislang unentdeckter Mechanismus führt häufig mehrere Gene mit zusammenhängenden metabolischen Aufgaben (z.B. die Produktion von aufeinanderfolgenden Enzymen in der Synthese einer Aminosäure oder eines Nukleotids). Ein bislang unentdeckter Mechanismus führt zur unterschiedlichen Synthese verschiedener Proteine, die alle durch ein und dasselbe mRNA-Molekül codiert werden; einige der Proteine werden viel häufiger gemacht als andere.

Die Kontrolle der Operon-Funktion durch ein Repressor-Operator-System hat negativen Charakter. Andere Operons stehen unter positiver Kontrolle. Sie funktionieren nur in Gegenwart eines Proteins, das ihre mRNA-Synthese spezifisch fördert. Wie dies auf molekularer Ebene geschieht, bleibt völlig unbekannt.

Zellen, deren mRNA-Moleküle metabolisch instabil sind, können das Spektrum ihrer Proteinsynthese bei drastischen Veränderungen in ihrer Umgebung (z.B. Nährstoffzufuhr) rasch umstellen. Das gilt besonders für Bakterien, deren mRNA-Moleküle eine durchschnittliche Lebensdauer von nur 2-3 Minuten haben.

Die Synthesegeschwindigkeit vieler Protein-Moleküle wird weder durch Repressoren noch durch Induktoren gesteuert (konstitutive Synthese). Einige Proteine werden mit konstanter und hoher Geschwindigkeit synthetisiert, andere in sehr geringem Ausmaß. Diese Kontrolle wird häufig durch die spezifischen

Nukleotidsequenzen ihrer Promotorgene erzielt. Einige Promotorsequenzen haben eine hohe Affinität für RNA-Polymerase, andere eine geringe. Da Repressoren im allgemeinen in sehr kleinen Mengen gemacht werden, haben ihre Promotorgene niedrige Affinität.

In Bakterien haben Operons, die beim Abbau bestimmter Zucker, wie Lactose und Arabinose, eine Rolle spielen, eine wesentlich geringere Effizienz wenn Glucose abgebaut wird. Diese Abbauprozesse der Glucose senken auf irgendeine Weise die intrazelluläre Konzentration von zyklischem AMP herab, das eine Schlüsselstellung bei der Transkription des Kataboliten-sensitiven Operons einnimmt. Zyklisches AMP wirkt zusammen mit einem spezifischen Protein während der Initiationsschritte der Transkription. Es bleibt zu zeigen, ob es sich bei diesem Protein um einen spezifischen  $\sigma$ -Faktor handelt.

Durch Endprodukt-Hemmung von Enzymfunktionen kann ebenfalls eine rasche Kontrolle über den Stoffwechsel der Zelle ausgeübt werden. Ein Endprodukt-Metabolit kann sich reversibel an das erste Enzym, das an seinem spezifischen Biosyntheseweg beteiligt ist, binden. Diese Verbindung wandelt das Enzym in eine inaktive Form um. Man nimmt heute an, daß der Endprodukt-Inhibitor nicht mit dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert, sondern sich an eine zweite Region bindet, wodurch eine Veränderung in der Gestalt des Enzyms hervorgerufen wird. Proteine, deren Gestalt und Aktivität durch Verbindung mit anderen Molekülen verändert werden, bezeichnet man als allosterische Proteine.

## LITERATUR

- Jakob, F., und J. Monod, «Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins», *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961). Ein sehr schöner Übersichtsartikel, der das Konzept der Messenger-RNA mit dem Problem der Kontrolle der Proteinsynthese verknüpft.
- Gilbert, W., und B. Müller-Hill, «Isolation of the Lac Repressor», *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.* **56**, 1891 (1966). Wie der erste Repressor isoliert wurde.
- Ptashne, M., «Specific Binding of the  $\lambda$ -Phage Repressor to  $\lambda$ -DNA», *Nature*, **214**, 232 (1967). Der erste Beweis, daß ein Repressor über die Bindung an DNA wirkt.
- Martin, R. G., «Control of Gene Expression», *Ann. Rev. Genetics*, **3**, 181 (1969). Eine Übersicht über den neuesten Stand der Literatur mit Hinweisen auf eine Vielzahl bakterieller Operons.
- The Lactose Operon*, J. Beckwith und D. Zipser (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1970. Eine Sammlung von Veröffentlichungen, die eine sehr klare Analyse der wichtigsten Systeme enthält, die bisher für die Untersuchung der Kontrolle der Proteinsynthese in Bakterien entwickelt wurden.
- Morse, D. E., R. D. Mosteller und C. Yanofsky, «Dynamics of Synthesis, Translation, and Degradation of *trp* Operon Messenger RNA in *E. coli*», *Cold Spring Harbor Symposium of Quant. Biol.*, **34**, 729 (1969). Die bisher vollständigste Untersuchung über die Kinetik von Synthese und Abbau der mRNA.

- Monod, J., J. P. Changeux und F. Jacob, «Allosteric Proteins and Cellular Control Systems», *J. Mol. Biol.*, **6**, 306-329 (1963). Eine vollständige Übersicht über die Probleme der Allosterie.
- Gerhart, J. C., und A. B. Pardee, «The Effect of the Feedback Inhibitor, CTP, on Subunit Interactions in Aspartate Transcarbamylase», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 491 (1963). Eine Zusammenfassung eines Enzymsystems, dessen Untersuchung für die Entwicklung des Konzepts der Allosterie wichtig war.



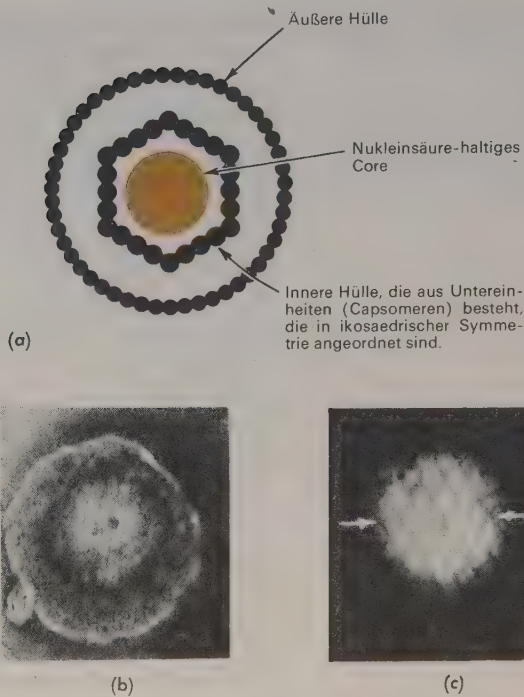
# 15

## DIE REPLIKATION VON VIREN

Das Interesse der Genetiker konzentrierte sich häufig auf Viren, da sie so einfach zu sein schienen. Am Anfang hielt man Viren für nackte Gene; langsam wurde jedoch klar, daß die Analogie zum nackten Chromosom richtiger sei. Von vielen Viren, die man ursprünglich für so einfach hielt, weiß man heute, daß sie mehrere hundert Gene tragen. Als man entdeckte, wie Bakterien eine unerwünschte Synthese verhindern können, hielt man es für wahrscheinlich, daß das Wesen der Existenz eines Virus im Fehlen solcher Regulationsvorrichtungen läge. In diesem Fall wären sie in der Lage, sich rasch auf Kosten des Wirtszellmetabolismus zu vermehren. Auch in dieser Beziehung stellten sich die ersten Vermutungen als falsch heraus. Sogar die Replikation der kleinsten Viren ist eine äußerst komplizierte Angelegenheit, die nur mit Hilfe eines hochentwickelten Regulationssystems möglich ist, das darauf ausgerichtet ist, die richtigen Moleküle zum richtigen Zeitpunkt im Vermehrungszyklus eines Virus zu synthetisieren. Bevor wir uns jedoch den Details dieser Frage zuwenden, müssen wir erst einige allgemeine Prinzipien der Virusstruktur und -vermehrung betrachten.

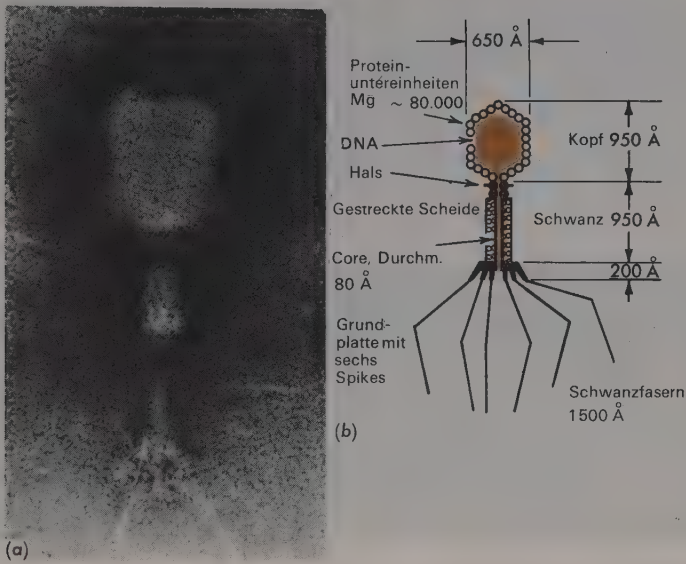
### CORE UND HÜLLE VON VIREN

Die Größe und strukturelle Komplexität von Viren kann stark variieren. Einige Viren haben Molekulargewichte von nur wenigen Millionen, wogegen andere fast so groß wie sehr kleine Bakterien sind. Alle Viren unter-

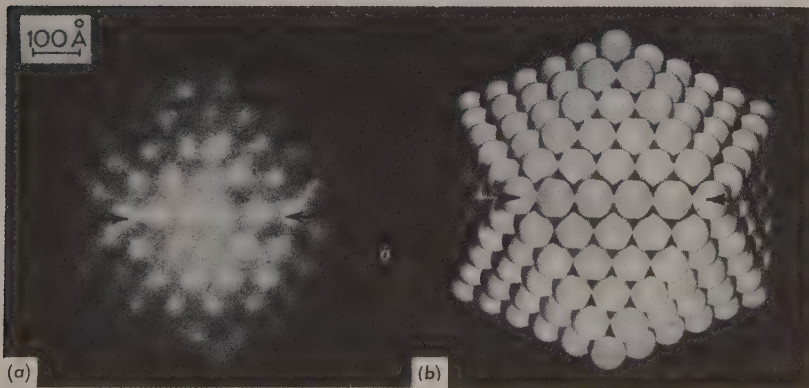


**ABBILDUNG 15-1** Die Morphologie des Herpes-Virus, eines großen DNA-haltigen Virus, das sich in tierischen Zellen vermehrt. (a) Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur, die das DNA-haltige Core eingebettet in einer regelmäßigen Hülle (Capsid) und eine äußere Hülle zeigt. (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme, die das Capsid (1000 Å) umgeben von einer Hülle (1500 Å) zeigt. (c) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Capsids bei großer Auflösung. Es enthält 162 Untereinheiten (Capsomere), die um fünffache, dreifache und zweifache Symmetrieachsen angeordnet sind. [(b) und (c) wiedergegeben mit Genehmigung von Wildy et al., *Virology*, **12**, 204 (1960).]

scheiden sich jedoch grundsätzlich von Zellen, die sowohl DNA wie RNA enthalten; Viren hingegen enthalten nur eine Art von Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA. Das genetische Material in Form der Nukleinsäurekomponente liegt immer im Inneren der Viruspartikel, von einer schützenden Hülle (Schale) umgeben. Einige dieser Hüllen sind ziemlich komplex; sie bestehen aus mehreren Schichten und sind aus einer Anzahl verschiedener Proteine aufgebaut; zusätzlich enthalten sie Lipide und Kohlenhydrate (Abbildungen 15-1, 15-2, 15-3). In anderen Fällen, z.B. beim Tabakmosaikvirus (TMV), das sich in Tabakpflanzen vermehrt, oder bei den kleinen RNA-Bakterien-viren F2, R17, Q $\beta$ , enthält die Hülle nur eine Art von Proteinmolekülen und keinerlei Lipide oder Kohlenhydrate.

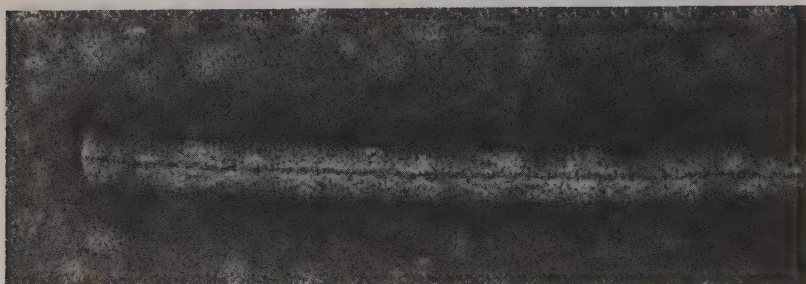


**ABBILDUNG 15-2** Die Struktur der T-gerade-(2,4, und 6)-Phagen-Partikel. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von T2 [Reproduktion nach R. W. Horne et al., J. Mol. Biol., **1**, 281 (1959), mit Genehmigung]. (b) Schematische Darstellung, die detailliert die im Elektronenmikroskop sichtbar gemachten Charakteristika zeigt.



**ABBILDUNG 15-3** Struktur des Adeno-Virus. Diese DNA-haltigen Viren, die sich in tierischen Zellen vermehren, haben eine sehr regelmäßige Struktur. (a) Partikel bei starker Vergrößerung; 252 Capsomere sind am Aufbau der äußeren Hülle beteiligt. (b) Modell eines Ikosaeders in der gleichen Orientierung [Reproduktion nach R. W. Horne et. al., J. Mol. Biol.; **1**, 86 (1959), mit Genehmigung].

Alle Virushüllen enthalten viele Kopien der Proteinkomponente (oder -komponenten), die häufig in helikaler, kubischer oder quasi-kubischer Symmetrie angeordnet sind. Die Hülle des TMV besteht z.B. aus 2150 identischen Proteinmolekülen (MG  $\sim 17.000$ ), die helixartig um ein zentrales RNA-Molekül von ca. 6000 Nukleotiden (Abbildung 15-4) angeordnet sind. Beim F2 oder R17-Virus gibt es 180 identische Proteine (MG  $\sim 14.000$ ), die kubisch um ein zentrales RNA-Molekül mit 3300 Nukleotiden angeordnet liegen.



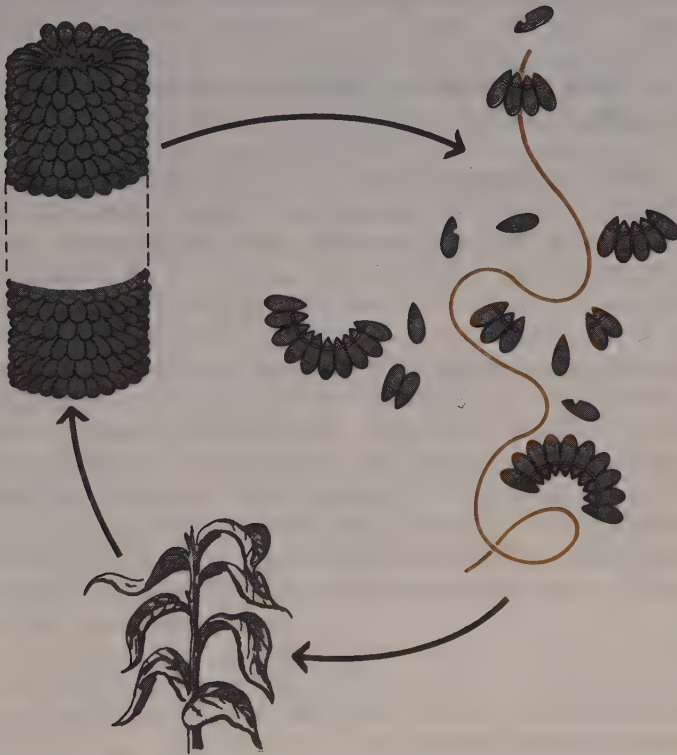
**ABBILDUNG 15-4** *Elektronenmikroskopische Aufnahme hoher Auflösung eines Endes einer TMV-Partikel. Der Durchmesser ist ca. 180 Å, während die Länge einer ganzen Partikel 3000 Å beträgt. Die Partikel ist mit einem dunklen Farbstoff bedeckt, der in das hohle, zentrale Core eindringt. [Photographie reproduziert nach J. T. Finch, J. Mol. Biol., 8, 872 (1964) mit Genehmigung].*

Die Verwendung einer großen Zahl identischer Proteinmoleküle beim Aufbau der Virushülle ist eine obligatorische Struktureigenschaft aller Viren. Sie ergibt sich aus ihrem begrenzten Nukleinsäuregehalt, der auch der maximalen Anzahl von Aminosäuren in den Proteinen, die das Viruschromosom codiert, eine absolute Grenze setzt. Z.B. können die  $\sim 6000$  Nukleotide der TMV-RNA-Kette  $\sim 2000$  Aminosäuren codieren, was einem Proteinmolekulargewicht von ca.  $2,5 \times 10^5$  entspricht. Das ist bedeutend kleiner als das Molekulargewicht der gesamten Proteinhülle von TMV ( $3,5 \times 10^7$ ). Selbst wenn die gesamte TMV-RNA nur für Hüllprotein codieren würde -was sie nicht tut- brauchte man immer noch 150 identische Proteinmoleküle. Die Verwendung einer großen Zahl identischer Proteinuntereinheiten ist der Grund, warum die einfacheren Viren, die oft nur eine Art von Proteinmolekülen in ihrer Hülle enthalten, entweder helixartige oder kubische (oder quasi-kubische) Symmetrie aufweisen. Nur in diesen beiden Symmetriegruppen können die identischen Proteinuntereinheiten regelmäßig (oder quasi-regelmäßig) gepackt sein und so -mit Ausnahme der Kontakte mit dem Nukleinsäure-Core- eine praktisch identische chemische Umgebung haben.



# NUKLEINSÄURE: DIE GENETISCHE KOMPONENTE ALLER VIREN

Viren liefern einen der besten Beweise dafür, daß die genetische Spezifität von den Nukleinsäuremolekülen getragen wird. Viele Virusnukleinsäuren können leicht von ihrer Proteinhülle getrennt und in hoch gereinigter Form gewonnen werden. Wenn man diese Nukleinsäuren zu Wirtszellen zugibt, entstehen neue infektiöse Viruspartikeln; jede gleicht den Partikeln, aus denen die Nukleinsäure isoliert wurde (Abbildung 15-5). Diese äußert wichtigen Versuche zeigen eindeutig, daß die Virusnukleinsäure die genetische Spezifität enthält, um sowohl ihre eigene Replikation wie die Aminosäuresequenzen ihrer spezifischen Hüllproteine zu codieren.



**ABBILDUNG 15-5** Beweis, daß RNA die genetische Komponente des TMV ist. Die stäbchenförmigen TMV-Partikeln können leicht in ihre Protein- und RNA-Komponenten gespalten werden, die dann getrennt auf ihre Fähigkeit untersucht werden, eine Virusinfektion zu geben. Nur die RNA-Moleküle haben diese Fähigkeit. Die Viruspartikeln, die durch Infektion mit reiner RNA produziert werden, sind mit jenen identisch, die nach Infektion mit dem intakten Virus entstehen.

Das gilt nicht nur für DNA-Viren, sondern auch für Viren, die RNA enthalten. Tatsächlich wurde die Infektiosität der viralen Nukleinsäure zum ersten Mal mit RNA, die aus TMV isoliert wurde, demonstriert. Vor diesem Beweis hatte es immer noch Zweifel am wirklichen genetischen Charakter der RNA Komponente aus TMV gegeben. Diese Unsicherheit kam daher, daß die überwiegende Mehrheit der TMV-Partikeln normalerweise nicht infektiös ist. Im allgemeinen dringt weniger als eine Partikel pro Million in ein Tabakblatt ein und dient als Elternteil für Virusnachkommenschaft. Man könnte daher behaupten, daß vielleicht diese eine seltene Partikel DNA enthielte. Die Isolierung von infektiöser TMV-RNA beseitigte jedoch jeden Zweifel und zeigte eindeutig, daß die Sequenz der Nukleotidbasen in der RNA, wie die in der DNA, genetische Information trägt.

### **VIRUSNUKLEINSÄURE KANN ENTWEDER EINZELSTRÄNGIG ODER DOPPELSTRÄNGIG SEIN**

Die Nukleinsäure der meisten Viren hat dieselbe Struktur wie die entsprechende zelluläre Nukleinsäure. Das heißt, die bekanntesten DNA-Viren, wie Pocken (oder der harmlosere Verwandte, *Vaccinia*), Polyoma und die T2, T4 und T6-Gruppen der Bakterienviren enthalten doppelsträngige helikale DNA. Entsprechend ist die RNA aus TMV, Influenza-Virus, Poliomyelitis-Virus und die der Bakterienviren F2 und R17 einzelsträngig. Es gibt jedoch verschiedene Gruppen von Bakterienviren, bei denen die DNA einzelsträngig ist; man kennt auch zumindest eine Gruppe von RNA-Viren (Reoviren), in welchen die RNA komplementäre, doppelhelikale Struktur annimmt.

Prinzipiell ist es gleichgültig, ob das genetische Material ursprünglich als Einzelstrang oder als doppelsträngige Helix vorliegt; der Einzelstrang kann nämlich bald nach Eintritt in eine geeignete Wirtszelle für die Bildung eines Komplementärstranges verwendet werden. Wirklich wichtig ist die Tatsache, daß die genetische Information als Sequenz von Nukleotidbasen vorliegt.

### **VIRUSNUKLEINSÄURE- UND PROTEINSYNTHESE LAUFEN UNABHÄNGIG VONEINANDER AB**

Was im Detail passiert, nachdem ein Virusnukleinsäuremolekül in eine empfangliche Wirtszelle eindringt, hängt vom spezifischen Virussystem ab. Besonders wichtig ist, ob das Virus DNA oder RNA enthält. Wenn das genetische Material DNA ist, dann fungiert die DNA während des Replikationszyklus sowohl als Matrize für ihre eigene Replikation als auch für

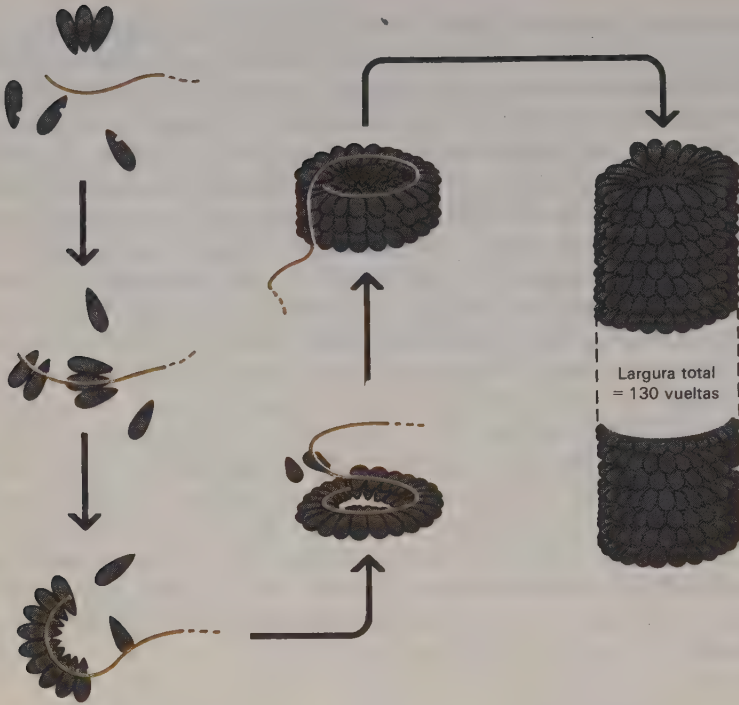
die der Virus-spezifischen RNA, die für die Synthese spezifischer Proteine notwendig ist. Genauso hat RNA, wenn sie die genetische Komponente ist, eine doppelte Matrizenrolle zu spielen: erstens muß sie mehr RNA-Moleküle machen und zweitens Virus-spezifische Proteine synthetisieren. In beiden Fällen ist das Endergebnis der Virusinfektion das gleiche: die Produktion vieler neuer Kopien sowohl der Virusnukleinsäure wie der Hüllproteine. Die neuen Nachkommenschaftsmoleküle aggregieren hierauf spontan unter Bildung reifer Viruspartikeln. Enzyme spielen im allgemeinen bei den endgültigen Aggregationsvorgängen keine Rolle, da bei den meisten Viren die Bildung neuer kovalenter Bindungen weder für eine stabile Virushülle noch dafür notwendig ist, die Hülle fest an das Nukleinsäure-Core zu binden. Nur schwache sekundäre Wechselwirkungen (ionische Bindungen, van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken) sind daran beteiligt. Letzteres wird besonders bei TMV deutlich. Hier können die stäbchenförmigen Partikeln nämlich vorsichtig abgebaut und die freien RNA- und Hüllproteinkomponenten getrennt werden. Wenn man die beiden Fraktionen wieder vereinigt, entstehen rasch neue infektiöse Partikeln, die den ursprünglichen Stäbchen völlig gleichen (Abbildung 15-6). Wir sehen also, daß die essentiellen Aspekte der Virusvermehrung bekannt sind, sobald man die Prinzipien versteht, nach denen Virusnukleinsäure und Proteinkomponenten getrennt synthetisiert werden.

### **VIRUSNUKLEINSÄUREN CODIEREN SOWOHL ENZYME ALS AUCH HÜLLPROTEINE**

Die Virusnukleinsäure muß als genetische Komponente die Aminosäuresequenzen des Proteins (der Proteine) codieren, aus dem (denen) die schützende Hülle besteht. Diese Hüllproteine findet man nie in normalen, uninfizierten Zellen; sie sind völlig spezifisch für ein bestimmtes Virus. Zusätzlich werden auch ein oder mehrere neue Enzyme synthetisiert, um eine erfolgreiche Virusvermehrung zu ermöglichen.

Man kennt heute viele Beispiele dafür, daß DNA-Viren Information für die Aminosäuresequenz von Enzymen tragen, die mit der Synthese ihrer Vorläuferrnukleotide verbunden sind. Einer der eindrucksvollsten Fälle betrifft die Vermehrung von T4 (Abbildung 15-7). T4-DNA enthält kein Cytosin, woraus man ursprünglich schloß, daß die T4-DNA womöglich ganz verschieden von normaler DNA sei. Statt dessen ist immer die nahe verwandte Base 5-Hydroxymethyl-cytosin vorhanden, die wie Cytosin Basenpaare mit Guanin bildet. Die 3D-Struktur der T4-DNA ist daher praktisch die gleiche wie die einer normalen doppelhelikalen DNA (Abbildung 15-8).

Man findet kein 5-Hydroxymethyl-cytosin in uninfizierten *E. coli* Zellen.



**ABBILDUNG 15-6** Bildung einer TMV-Partikel aus ihren Proteinuntereinheiten und ihrem RNA-Molekül. (Zeichnung nach H. Fraenkel-Conrat, Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses, Figure 18, Academic, New York, 1962).

Daher müssen die verschiedenen neuen Enzyme, die für seine Biosynthese erforderlich sind, von T4-DNA codiert werden. Zusätzlich ist die Synthesegeschwindigkeit der DNA in T4-infizierten Zellen um ein Vielfaches größer als in normalen Zellen. Diese größere Geschwindigkeit wird dadurch erreicht, daß andere T4-Gene sowohl viele der Enzyme codieren, die am normalen Nukleotid-Stoffwechsel beteiligt sind, als auch ein DNA-Polymerase ähnliches Enzym (Abbildung 15-9).

Ein neues Virus-spezifisches Enzym ist auch häufig notwendig, um die Freisetzung der Virusnachkommenschaft aus den Wirtszellen zu garantieren. Für Bakterienviren, die sich in Bakterien mit starren Zellwänden vermehren, ist das eine Lebensnotwendigkeit. Da diese Zellwände nicht spontan zerfallen, könnten sie die Virusnachkommenschaft dadurch inaktivieren, daß sie ihre Freisetzung und die Übertragung auf neue Wirtszellen verhindern. Viele Phagen tragen deshalb ein Gen, das die Aminosäuresequenz von Lysozym



Adsorption über das Schwanzende an *E. coli* Zellen. Injektion (Einspritzung) des DNA-Moleküls.

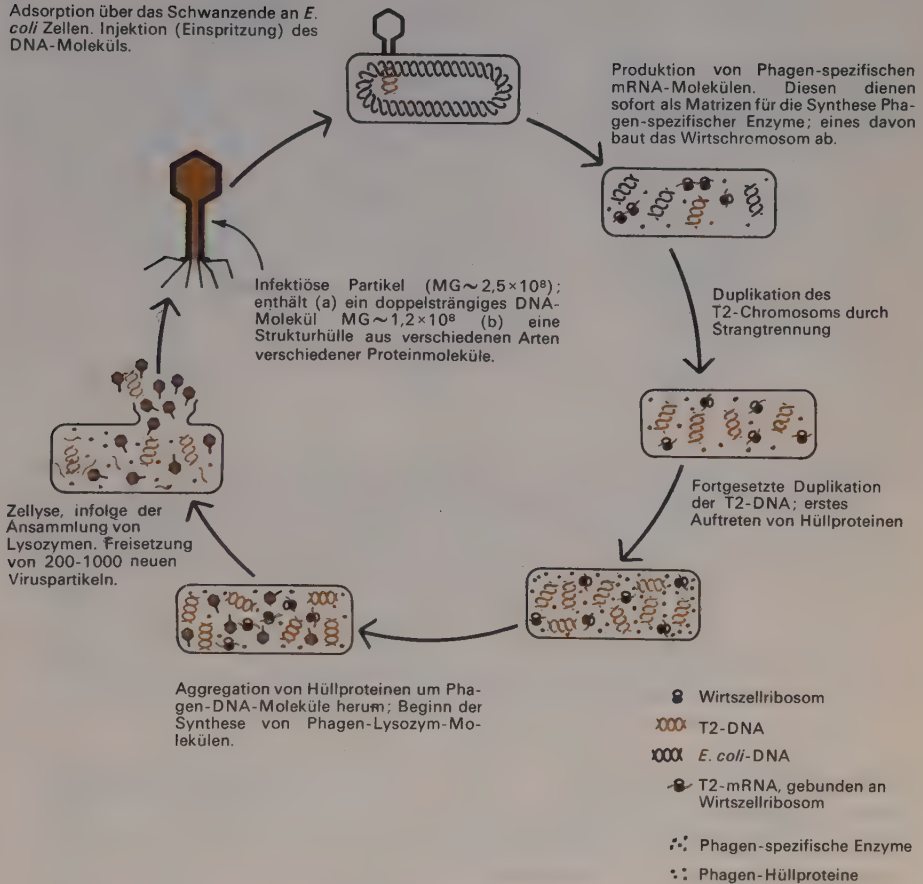
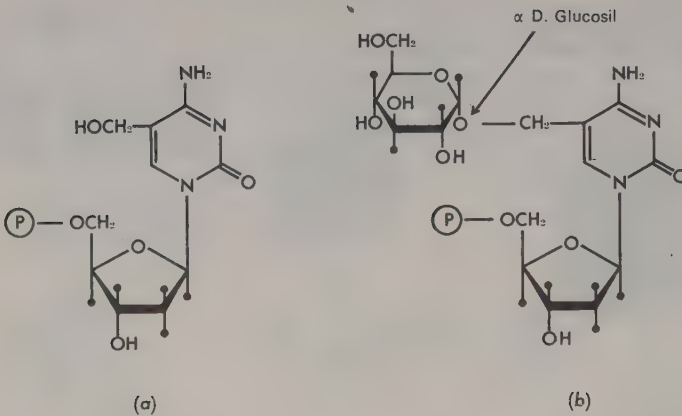


ABBILDUNG 15-7 Chemische Einzelheiten des Vermehrungszyklus des doppelsträngigen DNA-Virus T2 (T4).

codiert, einem Enzym, das die Zellwand zerstört. Die Synthese dieses Enzyms setzt ein, wenn die Hüllproteine erscheinen. Ungefähr zu dem Zeitpunkt, zu dem die Virusreifung komplett ist, führt es zum Platzen der Zellwand.

## VORGÄNGE BEI DER MORPHOGENESE

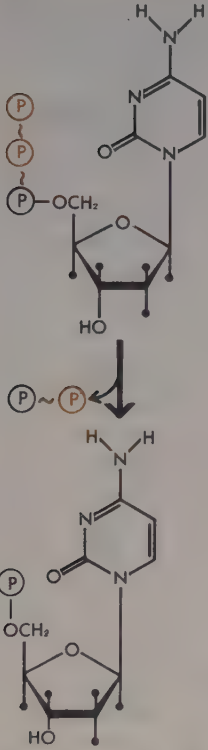
Der Zusammenbau von strukturell so komplexen Viren wie  $\lambda$  und T4 ist viel verwickelter als die simplen Aggregationsvorgänge, die für einfache



**ABBILDUNG 15-8** DNA aus Phagen der T-gerade-Gruppe enthält kein Cytosin. Statt dessen enthält sie die verwandte Base 5-Hydroxymethyl-cytosin (a), die die gleichen Basenpaarungen wie Cytosin eingeht. An einige der 5-Hydroxymethyl-Gruppen sind ein oder mehrerer Glucosestereste gebunden. (b) Zeigt die Base mit einem gebundenen Glucosemolekül. Man weiß vorläufig noch nichts Genaues über die biologische Bedeutung dieser seltenen Basen. Eine spekulative Hypothese behauptet, daß es ihre Funktion ist, die DNA von T-gerade-Phagen vor einem Phagen-spezifischen Enzym zu schützen, das nur unmodifizierte DNA abbaut. Diese Hypothese würde auch erklären, wie die E. coli-DNA während der Virussynthese selektiv abgebaut wird.

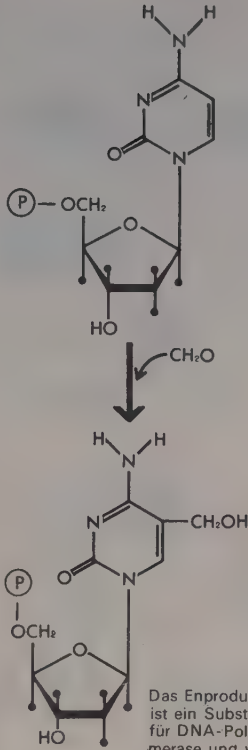
Viren wie TMV notwendig sind. Ca. 40 verschiedene T4-Genprodukte, jedes durch ein spezifisches T4-Gen codiert, treten bei der Bildung der reifen Viruspartikel in Wechselwirkung. Viele dieser Gene codieren verschiedene Strukturproteine, wobei mindestens ein anderes Gen ein Enzym codiert, das wahrscheinlich ein Vorläuferprotein in die Endform umwandelt, die in reifen T4-Partikeln gefunden wird. Beim Zusammenbau assoziieren sich die verschiedenen Komponenten zeitlich nicht willkürlich, sondern der Zusammenbau erfolgt in einer ganz bestimmten Reihenfolge (einem morphogenetischen Muster); Mechanismen, die man noch nicht versteht, verhindern, daß ein spezifischer Schritt stattfindet, bevor der vorhergehende Schritt beendet ist. Drei verschiedene Wege, von denen einer mit dem Zusammenbau des Kopfes, der andere mit dem des Schwanzes und der dritte mit den Schwanzfasern befaßt ist, treffen sich wie in Abbildung 15-10 gezeigt, um die endgültigen infektiösen Partikeln zu bilden.

Eines dieser Enzyme baut spezifisch die normale DNA-Vorstufe ab



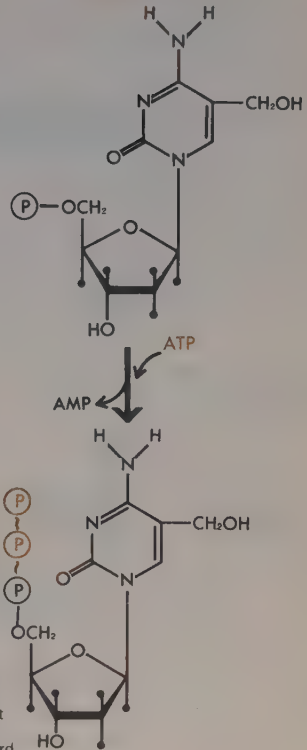
Dies erklärt warum man in DNA, die nach Infektion synthetisiert wird, kein Cytosin findet

Ein zweites Enzym wandelt um

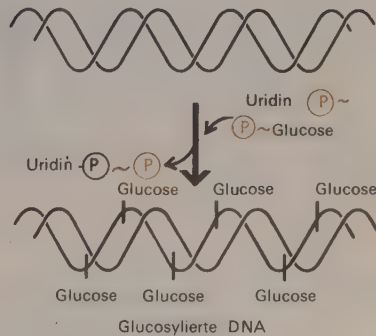


Das Endprodukt ist ein Substrat für DNA-Polymerase und wird in DNA eingebaut

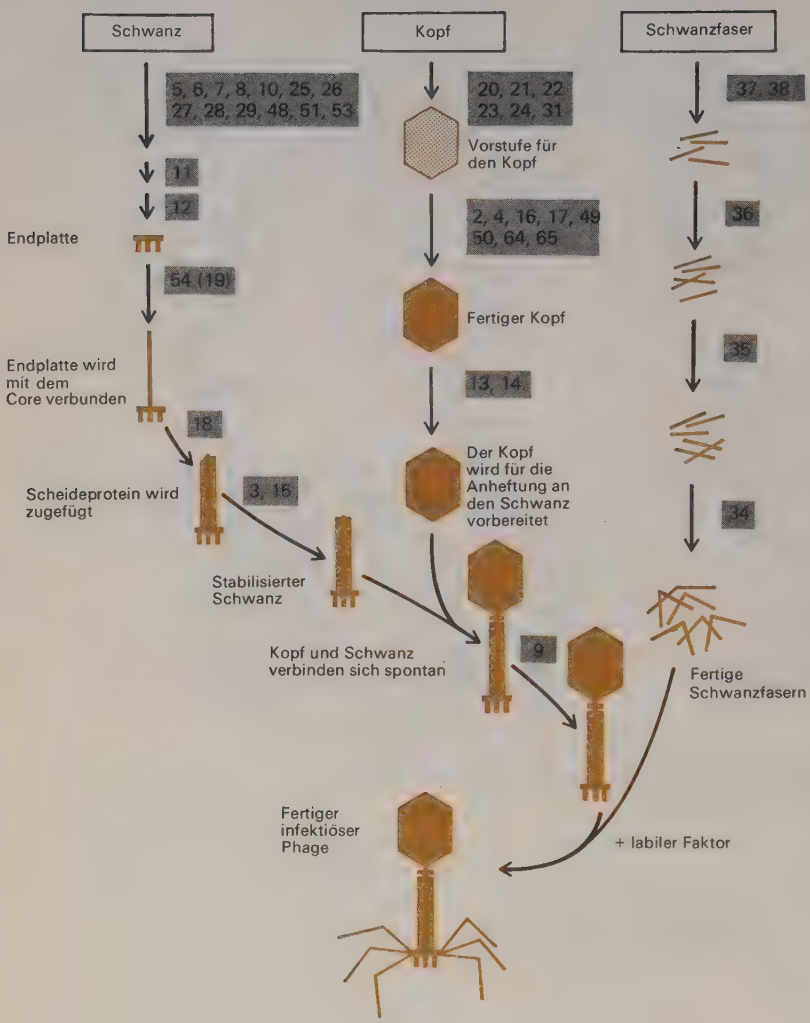
Ein drittes Enzym fügt die (P)~(P)-Gruppe hinzu



Noch ein weiteres Enzym fügt Glucose an die sonst fertigen DNA-Moleküle an



**ABBILDUNG 15-9** Der biochemische Mechanismus, der zur Synthese von DNA führt, die an Stelle von Cytosin 5-Hydroxymethyl-cytosin und seine Glucosederivate enthält. Sofort nach Infektion wird eine Reihe von spezifischen Enzymen synthetisiert. Diese werden durch die virale DNA codiert und jedes Enzym spielt eine spezifische Rolle dabei, die erfolgreiche Virusvermehrung zu garantieren.



**ABBILDUNG 15-10** Morphogenetische Schritte, die zur Bildung von T4-Partikeln führen. Die Zahlen beziehen sich auf die verschiedenen Gene, die an jedem Schritt beteiligt sind. (Zeichnung nach Wood und Edgar, Scientific American, Juli 1967).



## VIRUSINFEKTION FÜHRT HÄUFIG ZU DRASTISCHEN ÄNDERUNGEN IM STOFFWECHSEL DER WIRTSZELLE

Die Synthese Virus-spezifischer Nukleinsäuren und Proteine läuft manchmal Hand in Hand mit der normalen Syntheseleistung der Zelle ab. Die Chromosomen der Wirtszelle üben ihre Funktion häufig noch während eines beträchtlichen Teiles des viralen Vermehrungszyklus aus. In vielen Fällen wird jedoch bald nach der Infektion ein großer Teil des Zellstoffwechsels auf die Synthese neuer Moleküle umgeschaltet, die ausschließlich zur Produktion von Virusteilchen führt. In ganz extremen Fällen kommt die gesamte DNA- und RNA-Synthese an den Wirtszellchromosomen zum Stillstand, die bereits vorhandenen mRNA-Matrizen werden abgebaut und die gesamte folgende Proteinsynthese findet an neuen RNA-Matrizen statt, die durch die Virusnukleinsäure codiert werden.

Das Ausmaß zu dem ein Virus die Synthesemaschinerie des Wirtsorganismus zu kontrollieren vermag, unterliegt großen Variationen und ist sowohl von der Art des infizierenden Virus als auch von der Art der Wirtszelle abhängig. Im allgemeinen steigt die Zahl der viralen Gene, die am Abschalten von für die Produktion neuer Virusteilchen nicht notwendiger Wirtszellfunktionen beteiligt sind, mit steigendem Gehalt an Nukleinsäure des Virus. Man fängt erst langsam an, zu verstehen, wie diese Virus-spezifischen Gene den Zellstoffwechsel umsteuern. Während der T4-Vermehrung wird z.B. das Chromosom der *E. coli* Wirtszellen enzymatisch abgebaut, wahrscheinlich durch ein Enzym, das von der T4-DNA codiert wird. Das T4-Chromosom wird dagegen durch das Enzym nicht angegriffen, wahrscheinlich weil es die seltene Base 5-Hydroxymethyl-cytosin enthält. Dieser spezielle Abbau des Wirtszellchromosoms ist jedoch nicht der einzige Grund - und vielleicht nicht einmal ein sehr wichtiger - für die Beherrschung des Stoffwechsels durch das Virusgenom. Schon lange bevor man den Abbau des Wirtszellchromosoms nachweisen kann, hört es auf als Matrize für *E. coli* mRNA zu fungieren. Neue Versuche (siehe unten) legen nahe daß diese Tatsache auf die Inaktivierung des  $\sigma$ -Faktors der Wirtszelle zurückzuführen ist.

## SYNTHESE VIRUS-SPEZIFISCHER PROTEINE

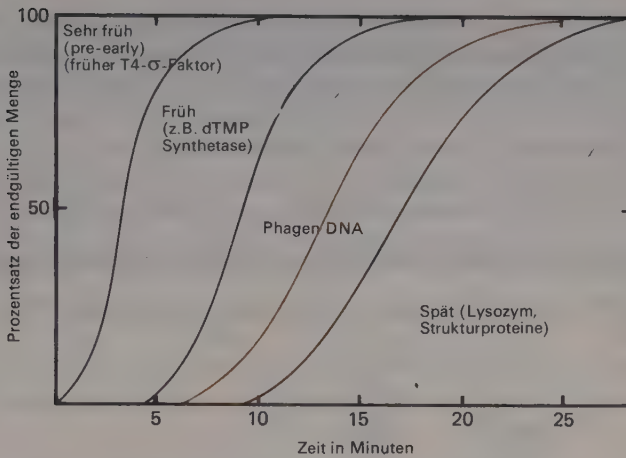
Virus-spezifische Proteine werden auf die gleiche grundlegende Weise wie zelluläre Proteine synthetisiert. Die Virus-spezifischen mRNA-Moleküle heften sich an die Wirtszellribosomen unter Bildung von Polyribosomen, an die die AS~tRNA-Vorstufen gebunden werden. Ebenso startet f-Met-tRNA alle Phagenproteine und die Signale für Kettenabbruch sind die

gleichen wie in der Wirtszelle. Es können jedoch Veränderungen in der Struktur der Wirtszellribosomen auftreten. Nach T4-Infektion werden die *E. coli* Ribosomen so modifiziert, daß sie besser mit T4-mRNA arbeiten können als mit Wirtszell-mRNA. Die genaue Beschaffenheit dieser Virus-induzierten Veränderungen muß erst ausgearbeitet werden. Zusätzlich kennt man nun verschiedene Fälle, in welchen nach Virusinfektion durch enzymatische Veränderung bereits vorhandener tRNA-Moleküle neue tRNA-Spezies entstehen. In einigen Virus-infizierten Zellen tauchen sogar völlig neue tRNA-Moleküle auf. Es können also virale Gene, genau wie Wirtszellgene, tRNA codieren.

Die Bedeutung dieser neuen tRNA-Spezies ist noch sehr unklar. In einigen Fällen mögen sie eine Anpassung an die durch das Virus hervorgerufenen Modifikationen der Ribosomenstruktur darstellen. In anderen Fällen stehen sie vielleicht mit Unterschieden in der Basenzusammensetzung zwischen den Viruschromosomen und den Wirtszellchromosomen im Zusammenhang. Zum Beispiel hat T4-DNA doppelt so viele A-T-Basenpaare wie G-C-Basenpaare, während *E. coli*-DNA ungefähr gleich große Mengen beider Arten enthält. Da nicht alle potentiell möglichen Wobble-Paare gleich stark sind, könnte das Wachstum eines A-T-reichen Virus unter Verwendung von tRNA, die an ein Chromosom mit gleichen Mengen aller vier Basen angepaßt ist, die Translation vieler Virus-spezifischer Proteine verlangsamen. Man kann sich daher einen selektiven Vorteil neuer tRNA-Spezies mit veränderten Anticodons vorstellen.

## DIE UNTERSCHIEDUNG ZWISCHEN FRÜH- UND SPÄTPROTEINEN

Im allgemeinen beginnen nicht alle Virusgene gleichzeitig ihre Funktion nachdem ein Viruschromosom in eine Zelle eingedrungen ist. Häufig beobachtet man statt dessen einen bestimmten Zeitplan, nach dem sie arbeiten. Einige Virusproteine treten sofort nach Infektion auf, während die Synthese anderer erst nach Beginn der zweiten Halbzeit des viralen Vermehrungszyklus beginnen kann. Außerdem fangen manche Gene früh zu arbeiten an und setzen ihre Arbeit während des gesamten Wachstumszyklus fort, während andere nur für wenige Minuten aktiv sind und dann abschalten (Abbildung 15-11). Dieses schrittweise Auftreten hat offensichtliche Vorteile. Einige der frühen Genprodukte sind Enzyme, die notwendig sind, um die zelluläre Synthese von Wirtsgenen auf Virusgene umzuschalten (diese müssen selbstverständlich früh angeschaltet werden), während andere, wie z.B. die Virus-hüllproteine oder Lysozym, das für die Lyse der Zelle notwendig ist, erst spät auftreten müssen. Wenn z.B. Lysozym ein frühes Enzym wäre, würde die Zellyse verfrüht eintreten, wodurch der Zusammenbau der Virusnach-



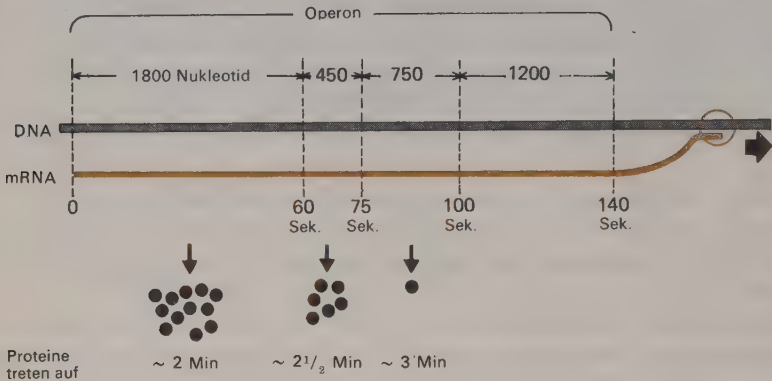
**ABBILDUNG 15-11** Zeitpunkt der Synthese einiger T4-spezifischer Proteine und der DNA bei 37°.

kommenschafterpartikeln abgebrochen werden würde. Sogar nur eine sehr oberflächliche Kenntnis des Vermehrungszyklus eines Virus legt daher nahe, daß recht raffinierte Kontrollmechanismen vorhanden sein müssen, um zu garantieren, daß die richtigen Proteine genau zu dem Zeitpunkt auftreten, zu dem sie gebraucht werden. Soweit wir wissen setzen diese Kontrollmechanismen im allgemeinen auf der Ebene der Transkription ein. Es treten also einige spezifische mRNA-Moleküle früh auf, während man andere erst spät im Wachstumszyklus findet. Es war anfangs praktisch, die verschiedenen mRNAs nur in zwei Kategorien einzuteilen, frühe und späte mRNA, und entsprechend ein bestimmtes Protein als früh oder spät zu klassifizieren. Die Situation ist jedoch häufig komplizierter und die Literatur ist voll von Ausdrücken wie «pre-early» (sehr früh), «early-late» (frühes Spätprodukt), und so weiter.

#### KONTROLLE DES ZEITPUNKTS DER GENFUNKTION DURCH ANORDNUNG DER GENE

Unter optimalen Wachstumsbedingungen werden für die Synthese eines mRNA-Moleküls vom MG ~ 2 Millionen etwa 3-4 Minuten benötigt. Moleküle dieser Größe (6000 Nukleotide) können 4-5 Proteine durchschnittlicher Größe codieren. Die Synthese dieser Proteine beginnt jedoch nicht gleichzeitig. Das Protein, das am 5'-Ende codiert wird, kann schon völlig übersetzt sein, bevor die Transkription des Gens am 3'-Ende überhaupt angefangen hat. Gene, die zuerst aktiv sein müssen, liegen daher eher am Beginn eines

Operons. Dementsprechend ist es manchmal sinnvoll, ein Gen, dessen optimaler Zeitpunkt für den Funktionsbeginn 3-4 Minuten nach Virusinfektion liegt, am 3'-Ende eines größeren Operons anzuordnen (Abbildung 15-12).



**ABBILDUNG 15-12** Schrittweiser Funktionsbeginn benachbarter Gene auf einem Operon. In vivo bei 37° wachsen E. coli mRNA-Ketten um ungefähr 30 Nukleotide/Sekunde. Die vollständige Transkription eines DNA-Abschnittes, der 4200 Basenpaare enthält, benötigt etwa 2 Minuten und 20 Sekunden. Die Anheftung der ersten Ribosomen beginnt Sekunden nachdem die Transkription angefangen hat. Da die Bewegung der Ribosomen während der Translation mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit wie die Transkription erfolgt, treten funktionstüchtige Genprodukte innerhalb weniger als einer Minute nach Beendigung der Transkription des entsprechenden Gens auf.

Das verzögerte Auftreten der «Spät-Proteine» kann jedoch nicht vollständig dadurch erklärt werden, daß ein sehr langes Operon vorliegt. Zum Beispiel sind bei T4 die meisten Operons ziemlich kurz und wenige enthalten mehr als mehrere Tausend Basenpaare. Trotzdem beginnt ein Drittel der etwa 200 Gene erst 10 Minuten nachdem das Chromosom in die Wirtszelle eingedrungen ist zu arbeiten.

## DIE SUCHE NACH DEN FEHLENDEN T4 REPRESSOREN

Um zu erklären, warum die späten Operons nicht transkribiert werden, wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Promotoren für die «späten» Operons durch hochspezifische, Virus-codierte Repressoren blockiert sind, die sofort nach Penetration des Viruschromosoms in die Wirtszelle synthetisiert werden. Indem sie sich an den Operator für späte Operons binden, könnten sie spezifisch die Synthese nennenswerter Mengen von später mRNA solange verhindern bis sie durch einen Induktor neutralisiert werden, der



selbst ein Produkt eines Virus-spezifischen Frühenzyms wäre. Der Beweis für solch eine Hypothese könnte durch das Auffinden einer Mutante erbracht werden, die den normalen Zeitplan durcheinanderbringt, indem sie die Repressorsynthese verhindert und es daher gestattet, daß alle späten Proteine früh gemacht werden. Trotz der Isolierung einer sehr großen Zahl von T4-Nonsense-Mutanten, gibt es nicht den geringsten Hinweis für einen T4-Repressor. Es häufen sich statt dessen die Beweise, daß positive und nicht negative Kontrolle der Schlüssel zur Entwicklung von T4 ist.

### $\sigma$ -FAKTOREN, DIE SPEZIFISCH FÜR SPÄTE mRNA SIND

Erst kürzlich wurde gezeigt, daß Virus-spezifische  $\sigma$ -Faktoren eine zentrale Rolle bei dieser positiven Kontrolle spielen. Es sind bereits mehrere Phagen bekannt, bei denen die Umstellung von früher mRNA-Synthese auf späte durch den Ersatz eines RNA-Polymerase- $\sigma$ -Faktors durch einen anderen verursacht wird. Im allgemeinen werden die Promotoren für die frühen Gene durch ein  $\sigma$  (mehrere?) erkannt, das in der uninfizierten Zelle vorhanden ist, während die Promotoren, die die späten Gene kontrollieren, durch Virus-spezifische  $\sigma$ -Faktoren erkannt werden. Das bedeutet, daß ein oder mehrere Virusgene  $\sigma$ -Faktoren codieren.

Der nicht besonders komplizierte Wachstumszyklus von T4 erfordert zwei verschiedene Virus-spezifische  $\sigma$ -Faktoren. Unmittelbar nachdem das T4-Chromosom in die Wirtszelle eindringt, nimmt eine Gruppe von Genen, die als «sehr früh» (pre-early) bezeichnet werden, ihre Funktion auf, unter Verwendung des Wirtszell- $\sigma$ -Faktors zur Erkennung ihrer betreffenden Promotoren. Eines dieser sehr frühen Gene codiert einen Virus-spezifischen  $\sigma$ -Faktor, der die sogenannten «frühen» Gene erkennt. Diese beginnen 3-4 Minuten nach Infektion zu arbeiten. Gleichzeitig verschwindet der  $\sigma$ -Faktor des Wirtes, sodaß sowohl die Transkription der gesamten Wirtszell-mRNA als auch die der sehr frühen T4-mRNA aufhört. Ungefähr 10 Minuten nach Infektion tritt ein zweiter T4- $\sigma$ -Faktor auf, der durch eins der frühen Gene codiert wird, und dieser erkennt die Promotoren für die späten Gene. Dieser späte  $\sigma$ -Faktor ersetzt das frühe  $\sigma$ , so daß die frühe Synthese bald nachdem größere Mengen von spätem  $\sigma$  auftreten, aufhört.

Parallel zu diesen Veränderungen bezüglich der Art der jeweils vorhandenen  $\sigma$ -Faktoren, laufen zwei schrittweise Modifikationen in der Struktur der Polymerase-Core-Komponente ab. Die erste Modifikation verhindert wahrscheinlich, daß der  $\sigma$ -Faktor (-en) des Wirtes sich an das Core bindet, während die zweite Modifikation vielleicht die Umstellung von früher auf späte Synthese fördert. Eine intensive Suche nach den T4 Genen, die für frühe und späte  $\sigma$ 's codieren und nach den Proteinen, die das Polymerase-Core verändern, ist im Gange.



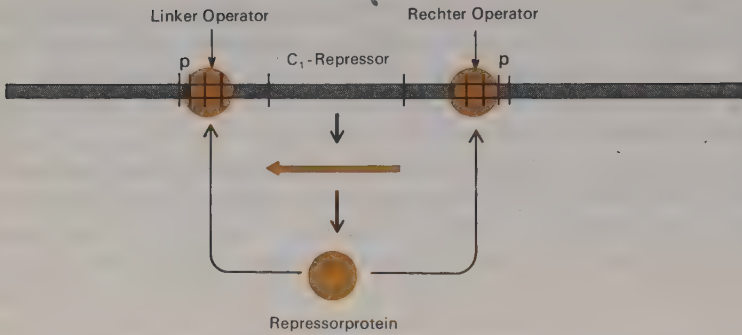
mRNA. Statt dessen blockiert der Repressor praktisch die gesamte  $\lambda$ -spezifische mRNA-Synthese. Um seine Rolle zu verstehen, müssen wir im Auge behalten, daß  $\lambda$  (siehe Abbildung 7-10) ein lysogener Phage ist, der sowohl zu einer normalen lytischen Vermehrung in *E. coli* wie zur Existenz im Prophagenzustand als Teil des *E. coli* Chromosoms fähig ist. Wenn  $\lambda$  als Teil des Wirtschromosoms vorliegt, ist die Transkription praktisch aller seiner Gene blockiert. Der  $\lambda$ -Repressor ist für diese Inhibition verantwortlich. Daher ist das einzige Gen, das im Prophagenzustand funktioniert, das Gen  $C_1$ , das den Repressor selbst codiert (Abbildung 15-14). Dieser Repressor, der normalerweise nur in wenigen Kopien vorliegt, bindet an zwei spezifische Operatoren, von denen jeder ein spezifisches frühes mRNA-Molekül codiert.

Inaktivierung des  $\lambda$ -Repressors findet häufig unter Bedingungen statt, unter denen DNA-Synthese gehemmt ist (z.B. nach Behandlung mit UV-Licht). Dadurch wird der Beginn der mRNA Transkription an den beiden frühen Operons ermöglicht (Abbildung 15-14). Eines dieser Operons ist hauptsächlich mit Genen besetzt, die Proteine codieren, welche für die Rekombinationsvorgänge verantwortlich sind, durch die das  $\lambda$ -Chromosom aus dem *E. coli* Chromosom freigesetzt wird (siehe Kapitel 7). Das andere frühe Operon enthält unter anderem die Gene, die spezifisch für die Replikation der  $\lambda$ -DNA gebraucht werden.

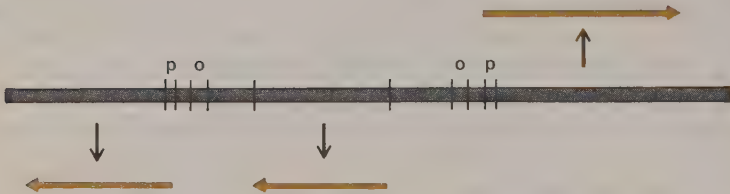
Eines der zuerst transkribierten frühen Gene führt auf noch unbekannte Weise zur Beendigung der Synthese der  $C_1$ -(Repressor)-mRNA. Es ist noch nicht bekannt, welches Gen im Detail beteiligt ist, aber es gibt Hinweise dafür, daß es unmittelbar rechts vom  $C_1$  Gen liegt. Das Abschalten der Repressor-mRNA ist sicherlich sinnvoll, da neue Repressoren weder gebraucht werden noch während des restlichen Vermehrungszyklus erwünscht sind.

#### POSITIVE KONTROLLE AUSGEÜBT DURCH DEN ANTITERMINATIONSFAKTOR DES «N» GENS

Die Aufhebung der Repression führt von selbst jedoch nicht zur vollständigen Transkription der frühen Operons. Für diesen Vorgang ist noch die Funktion des entscheidenden  $\lambda$ -Gens «N» notwendig. In Abwesenheit des «N»-Genproduktes beginnt die mRNA-Synthese an den beiden betreffenden Promotorstellen. Die Elongation läuft aber nur über eine relativ kurze Strecke ab bis benachbarte Abbruchsignale durch einen *E. coli* RNA-p-Faktor (Terminationsfaktor) erkannt werden. Das «N»-Protein wirkt auf irgendeine Weise spezifisch dem Terminationsfaktor entgegen, wodurch es möglich wird, wesentlich spätere Teile beider Operons abzulesen (Abbildung 15-15). Man weiß noch nicht, wodurch die Synthese dieser wesentlich längeren



(a) Im lysogenen Zustand bindet sich der  $\lambda$ -Repressor an den linken und rechten Operator, wodurch der Beginn der Transkription sowohl am linken wie am rechten Promotor verhindert wird.



(b) Wenn der  $\lambda$ -Repressor inaktiviert wird, beginnt die Transkription am linken Promotor nach links und am rechten Promotor nach rechts abzulaufen.

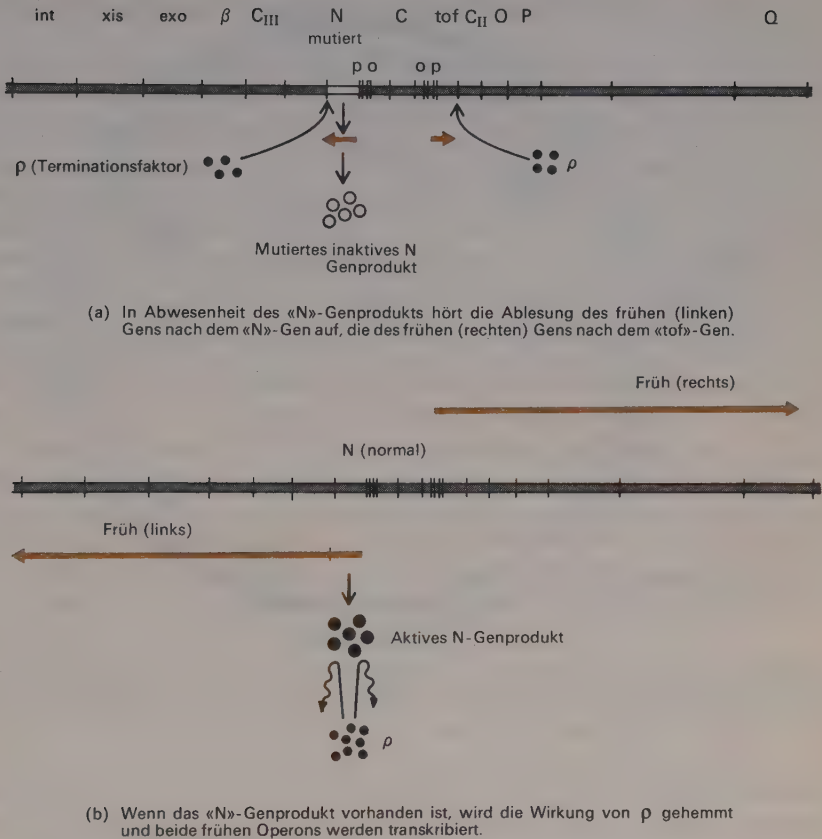
**ABBILDUNG 15-14** Wirkung des  $\lambda$ -Repressors bei der Verhinderung der Synthese sowohl früher (links) wie später (rechts)  $\lambda$ -mRNA-Klassen.

Ketten abgebrochen wird. Vielleicht gibt es in *E. coli* mehr als ein Stoppsignal und entsprechend mehrere Terminationsfaktoren, von denen nur einer durch das «N»-Protein neutralisiert wird.

### EIN EINZIGER PROMOTOR FÜR ALLE SPÄTEN $\lambda$ -GENE

Ungefähr die Hälfte des genetischen Materials von  $\lambda$  ( $\sim 20$  Gene) codiert «späte» Proteine, von denen die meisten an der Synthese der Kopf- und Schwanzkomponenten beteiligt sind. Alle diese «späten» Gene gehören einem einzigen Operon an, das vor dem «S»-Gen beginnt und nach dem «J»-Gen

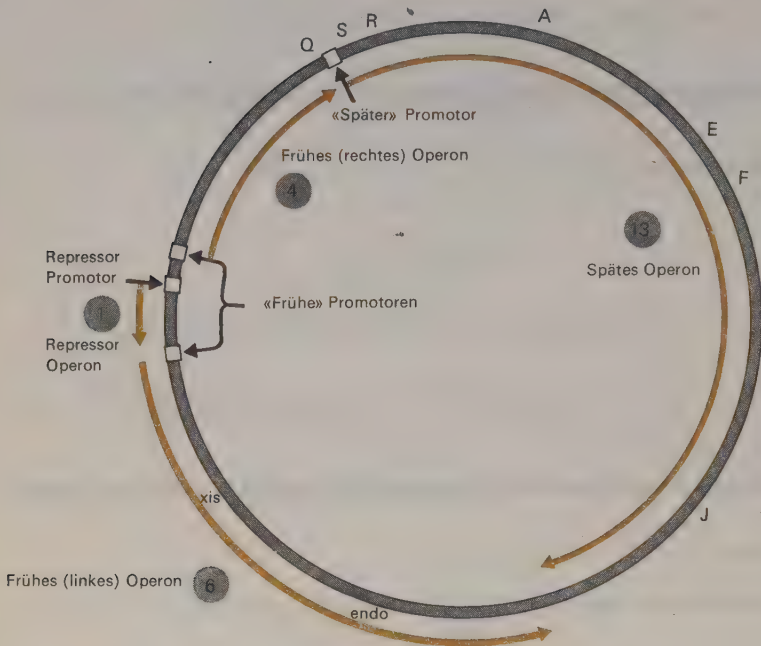




**ABBILDUNG 15-15** Gegenwärtige Vorstellungen über die Wirkung des  $\lambda$ -«N»-Gens als Antiterminationsfaktor.

endet (Abbildung 15-16). Dieses Operon arbeitet nur in Gegenwart eines Proteins, das von dem «frühen» Gen «Q» gemacht wird. Man könnte sich vorstellen, daß «Q» ein  $\sigma$ -ähnlicher Faktor ist, der für das Ablesen des «späten» Promotors notwendig ist. Dieser Punkt sollte bald experimentell geklärt sein.

Das «Q»-Gen liegt in der Transkriptionszeit etwa 4 Minuten von seinem Promotor entfernt. Das erste Proteinprodukt dieses Gens tritt daher erst 5 Minuten nach dem Beginn der Infektion auf und es dauert ca. 10 Minuten nach Infektion bis ausreichend «Q» Produkte für eine nennenswerte Transkription später mRNA vorhanden sind. Eine weitere Kontrolle über den Vermehrungszyklus von  $\lambda$  wird dadurch erreicht, daß alle «späten» Gene



**ABBILDUNG 15-16** Die vier Operons des  $\lambda$ -Phagen. Die Zahlen geben die ungefähren Zeiten, die bei 37° für die vollständige Transkription der betreffenden Operons benötigt werden.

in einem einzigen Operon zusammengefaßt sind. Z.B. trennen ca. 10.000 Basenpaare die Gene für die hauptsächlichen Proteine des Kopfes von denen, die die Schwanzfasern codieren. Das bedeutet, daß der endgültige Zusammenbau des Schwanzes erst 5 Minuten nach dem des Kopfes beginnen kann.

Angesichts einer so guten Kontrollmöglichkeit des Einsetzens von Synthese durch die Verwendung besonders langer Operons muß man sich fragen, warum es überhaupt ein getrenntes Operon für die späten Proteine gibt. Die Antwort liegt in der Tatsache, daß wesentlich größere Mengen von «später» als von «früher» mRNA benötigt werden. Die meisten, oder vielleicht sogar alle frühen Genprodukte, sind Enzyme, während viele der späten Proteine Strukturproteine sind, die in großen Mengen gebraucht werden. Aus diesem Grund ist ein Mechanismus notwendig, der große Mengen später mRNA-Synthese 8-10 Minuten nach dem Funktionsbeginn der frühen Operons anschaltet. Die Evolution eines Genproduktes, welches einem neuen Promotor erlaubt, seine Funktion aufzunehmen, erreicht auf einfache Weise dieses Ziel.

## KLEINE DNA-PHAGEN BESTEHEN AUS EINEM EINZIGEN OPERON

Bei den sehr kleinen DNA Phagen wie  $\phi \times 174$  (S13) und F1 (fd, M13) sind die Transkriptionsvorgänge wesentlich einfacher. Jeder dieser Phagen hat ein zirkuläres Chromosom, das etwa 5500 (6000) Nukleotide enthält, von dem man annehmen könnte, daß es für sechs bis acht Proteine mit einer durchschnittlichen Kettenlänge zwischen 200-300 codiert. Tatsächlich wurden bereits acht Gene innerhalb  $\phi \times 174$  und M13 identifiziert und damit besteht die erfreuliche Möglichkeit, daß bereits alle Gene bekannt sind.

Vier der  $\phi \times 174$  Gene werden gebraucht, um die Strukturproteine zu codieren. Ursprünglich nahm man wegen ihrer geringen Größe an, daß die Proteinhülle durch regelmäßige Aggregation eines einzigen Proteins aufgebaut würde. Es wurden jedoch bis jetzt vier unterschiedliche Proteine identifiziert, mit Molekulargewichten von 60.000, 36.000, 19.000 und 5.000. Für sie müssen insgesamt 3300 Nukleotide codieren, das heißt ca. 60% des gesamten Chromosoms. Man weiß, daß eines der restlichen vier Gene an der Replikation des doppelsträngigen DNA Zwischenproduktes beteiligt ist, (Abbildung 9-10); ein anderes Gen wird bei der Produktion der zirkulären Einzelstränge der Nachkommenschaft wirksam und ein weiteres Gen führt zu Zellyse. Es ist zu hoffen, daß innerhalb der nächsten 10 Jahre die exakte Aufgabe aller Gene dieser Phagen bekannt sein wird.

Die Synthese Virus-spezifischer mRNA beginnt sobald die doppelsträngigen Zwischenstufen gebildet sind. Die gesamte mRNA ist dem «-»-Strang des Virus komplementär und wird anscheinend als eine lineare Einheit transkribiert, die durch eine vollständige Ablesung des Genoms entsteht. Bis jetzt wurde die Stelle, an der der Promotor sitzt, noch nicht lokalisiert. Die relative Entfernung der einzelnen Gene voneinander spielt wahrscheinlich keine wesentliche Rolle bei der Kontrolle, da die Transkription des gesamten Genoms bei 37° nur etwa 2 Minuten dauert, während der entsprechende Vermehrungszyklus des Virus ungefähr 20 Minuten beansprucht. Eine weitere intensive Erforschung dieser Viren scheint angezeigt, da in Anbetracht ihrer geringen Größe, die Ausarbeitung aller wesentlichen Details ihrer Replikation im Bereich des Möglichen liegt.

## SELBSTREPLIKATION DER VIRUS-RNA: BEDARF FÜR EIN NEUES VIRUS-SPEZIFISCHES ENZYM

Zelluläre mRNA-Moleküle dienen niemals als Matrize für die Bildung neuer RNA-Ketten. Die Replikation der meisten RNA-Viren erfordert die Beteiligung eines völlig neuen Enzyms, das fähig ist, neue RNA-Stränge von parentalen RNA-Matrizen abzulesen. Dieses Enzym wird RNA-Synthetase

oder-Replikase genannt und wird im allgemeinen unmittelbar nach Eintritt der viralen RNA in eine Zelle und ihrer Anheftung an Wirtszellribosomen gebildet. Wie DNA- und RNA-Polymerase, katalysiert die RNA-Synthetase die Synthese eines Komplementärstranges an einer einsträngigen Matrize. Der Mechanismus für die exakte Kopierung der Basensequenzen ist daher für alle Nukleinsäuren gleich. Es wird immer die Paarung komplementärer Basen für eine genaue Replikation spezifischer Nukleotidsequenzen herangezogen.

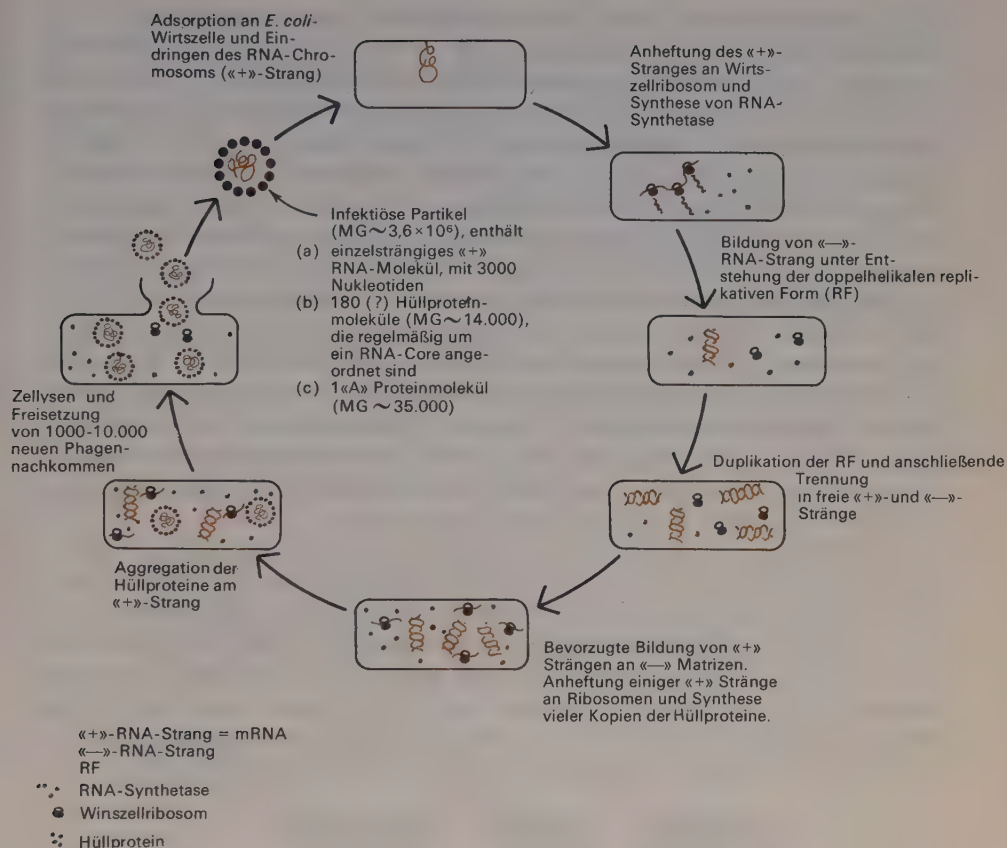
Kurz nach ihrer Bildung dienen komplementäre RNA Doppelhelices (Abbildung 15-17) als Matrizen für neue Ketten, von denen einige in die Virusnachkommenschaft eingebaut werden, während andere als Matrizen zur Bildung spezifischer Proteine dienen (Abbildung 15-18). Wie das genau geschieht hängt davon ab, ob das reife Virus einzelsträngige oder doppelsträngige RNA enthält. In jedem Fall wird jedoch nur einer der beiden Komplementärstränge als Matrize für Proteinsynthese, das heißt als mRNA eines bestimmten Gens verwendet. Die Bildung der mRNA in DNA- und RNA-Virusssystemen verläuft daher ähnlich.



**ABBILDUNG 15-17** Elektronenmikroskopische Aufnahme (von P. H. Hofschneider, München) dreier doppelhelikaler Replikationszwischenstufen des einzelsträngigen RNA-Virus M12. Jedes Molekül ist ca.  $1\mu$  lang. [Reproduziert nach P. H. Hofschneider, J. Mol. Biol., 10, 559 (1964) mit Genehmigung].

Bei der Vermehrung der meisten einzelsträngigen RNA-Viren dient der gleiche Strang als Matrize, der auch in der reifen Partikel gefunden wird, also der «+»-Strang. Der infektiöse Strang kann daher für RNA-Synthetasmoleküle codieren, die für den Beginn der viralen RNA-Replikation notwendig sind. Anders verhält sich jedoch das Vesicular Stomatitis Virus (VSV), ein einsträngiges RNA-Virus. Bei diesem Virus dient der «-»-Strang als Matrize für die Virus-spezifischen Proteine. Dies führt zu der Frage nach dem Ursprung der RNA-Synthetasmoleküle, die notwendig sind, um





**ABBILDUNG 15-18** Der Vermehrungszyklus eines einzelsträngigen RNA-Virus aus der F2-(R17, M12, usw.)-Familie.

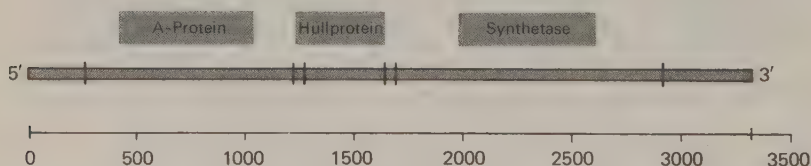
«-»-Stränge an infektiösen «+»-Strängen herzustellen. Kürzlich wurde gefunden, daß die Quelle der Synthetasemoleküle die infizierenden Viruspartikeln selbst sind. Jedes Vesicular Stomatitis Virus trägt in sich gepackt ein Synthetasemolekül, das während des vorherigen Infektionszyklus gemacht wurde.

## RNA-PHAGEN SIND ÄUSSERST EINFACH

Alle RNA-Phagen, die bis jetzt charakterisiert wurden (R17, F2, Q $\beta$  usw.) enthalten eine Nukleinsäurekette mit etwas über 3.300 Nukleotiden. Sie

sind die einfachsten bisher bekannten Viren, da sie nur etwa 1.100 Aminosäuren codieren können. Die Hüllproteine von R17 und F2 bestehen aus zwei Arten von Polypeptidketten. Eine, das Hüllprotein (CP = coat protein) hat ein Molekulargewicht von 14.700 und ist in jeder Viruspartikel 180 mal vertreten. Die Sequenz seiner 129 Aminosäuren ist jetzt vollständig bekannt. Das andere Strukturprotein ist das «A» Protein (von A für attachment, Anheftung), das für die Adsorption dieser Phagen an ihre Bakterienwirte gebraucht wird. Jede Viruspartikel enthält eine Kopie. Es hat ein Molekulargewicht von etwa 35.000 und besteht aus ca. 320 Aminosäuren. Etwa die Hälfte des genetischen Materials eines RNA-Phagen wird daher für die Codierung der Strukturproteine aufgebraucht. Ein drittes Virus-spezifisches Protein ist die RNA-Synthetase (Replikase), die an der Selbstreplikation der RNA-Ketten beteiligt ist. In der einzigen Polypeptidkette der Synthetase findet man zwischen 500 und 600 Aminosäuren, was nur mehr 300-600 Nukleotide übrig läßt, deren Rolle bei der Codierung noch unbekannt ist. Falls somit ein viertes Gen existierte, müßte es daher sehr klein sein und nur eine relativ kurze Peptidkette codieren.

Das Vorhandensein dreier hauptsächlicher Genprodukte wird durch genetische Analysen weiter unterstützt. Die Verwendung von Mutagenen führt zu Nonsense-Mutationen, die in drei Komplementationgruppen fallen und den CP-, «A»- und Synthetasegenen (SYN) zugeschrieben wurden. Die Anordnung der Gene kann jedoch nicht durch genetische Tricks herausgefunden werden, da während der Replikation der RNA-Phagen keine genetischen Rekombinationen auftreten. Vor kurzem wurde die Genanordnung (5'A-CP-SYN<sup>3'</sup>) durch Nukleotidsequenzanalysen etabliert (Abbildung 15-19).

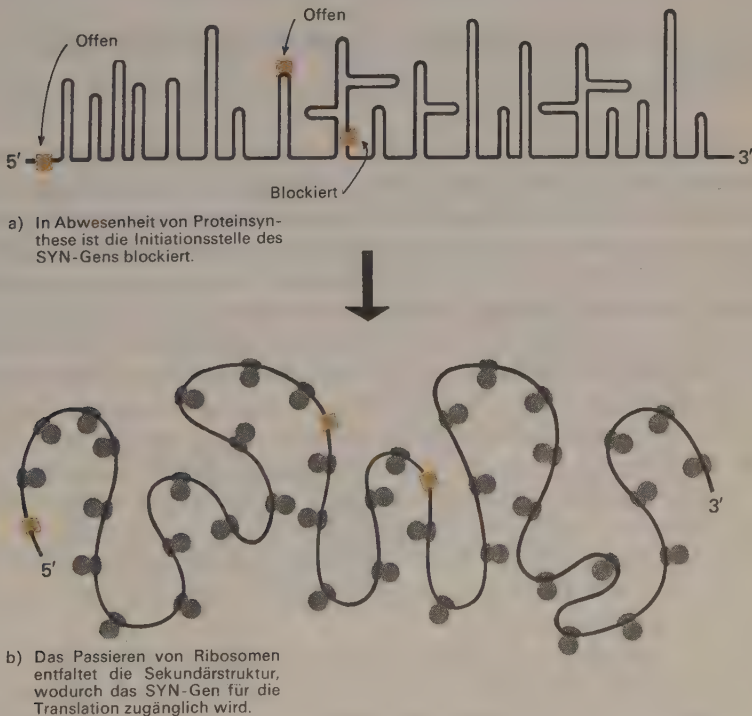


**ABBILDUNG 15-19** Die bekannten Gene des R17-Phagen in maßstabgetreuer Darstellung ihrer Größen und ihrer relativen Positionen, die sich kürzlich aus Nukleotidsequenzanalysen ergaben. Die Zahlen beziehen sich auf den tatsächlichen Nukleotidabstand von 5'-Ende der RNA-Kette.

## ANFÄNGLICHE BINDUNG VON RIBOSOMEN AN ZWEI UNABHÄNGIGEN STELLEN

Bei der Vermehrung von R17 (Q $\beta$ ) heften sich die Ribosomen anfänglich an zwei verschiedene Stellen: an den Beginn des «A»-Gens und den des

CP-Gens. Sie können sich anfänglich nicht an das Synthetasegen binden, da seine Bindungsstelle wegen der vorliegenden Sekundärstruktur nicht exponiert ist; sie wird erst zugänglich, wenn die Ablesung des CP-Gens zeitweilig die hinderlichen, über Wasserstoffbrücken verbundenen haarnadelartigen Schlingen auffaltet. Die Funktionstüchtigkeit des Synthetasegens hängt daher davon ab, daß sich Ribosomen zuerst an die CP-Bindungsstelle heften (Abbildung 15-20). Die ersten Hinweise für diese besonderen Bedingungen kamen von polaren Nonsense-Mutanten im CP-Gen, die die Funktion des Synthetasegens verhinderten. Nonsense-Mutationen im Synthetasegen beeinflussten dagegen niemals das CP-Gen. Weitere Versuche zeigten, daß Nonsense-Mutationen im «A»-Gen keinerlei Effekt, weder auf das CP- noch auf das SYN-Gen, hatten. Diese Versuche wurden zuerst dahingehend interpretiert, daß das «A»-Protein am fernen (3')-Ende läge. Man weiß jetzt jedoch, daß Polaritätsversuche nicht notwendigerweise zu einer klaren Antwort über die Lokalisation von Genen führen, wenn mehr als eine Bindungsstelle für Ribosomen vorliegt.



**ABBILDUNG-15-20** Schematische Darstellung des Einflusses der Sekundärstruktur auf die Zugänglichkeit der Bindungsstellen für Ribosomen.

## POLARITÄTSGRADIENTEN

Nicht alle Nonsense-Mutationen sind polar. Im allgemeinen sind nur die am 5'-Ende eines gegebenen Gens extrem polar, während zum 3'-Ende ein Polaritätsgradient besteht. Wenn ein Ribosom auf ein Kettenabbruchscodon stößt, wird eine unvollständige Polypeptidkette freigesetzt und das Ribosom löst sich im allgemeinen von der mRNA-Matrize. Dieses Ribosom oder ein anderes wird keine große Chance haben, an einem weiter hinten liegenden Gen zu arbeiten, wenn dessen Bindungsstelle nicht exponiert ist. Die Wahrscheinlichkeit, daß sie exponiert ist, hängt aber davon ab, wieviel des nach dem 5'-Ende hin benachbarten Gens abgelesen wurde. Nonsense-Mutationen am 3'-Ende eines Gens beeinträchtigen daher im allgemeinen nicht die Ableitung nachfolgender Gene. Zu dem Zeitpunkt, zu dem ein Ribosom auf diese Nonsense-Mutationen trifft, sind die haarnadelartigen Schlingen, die die nächste Ribosomenbindungsstelle enthalten, bereits geöffnet.

## DIE DREI R17-PROTEINE WERDEN NICHT IN GLEICHEN MENGEN PRODUZIERT

Die Hüllproteinmoleküle des RNA-Phagen werden in viel größerer Menge hergestellt als die beiden anderen Virus-spezifischen Proteine (ungefähr 10 CP: 1 A : 1 SYN). Diese Unterschiede haben verschiedene Ursachen. Erstens haben Ribosomen eine wesentlich geringere Affinität für die Bindungsstelle von «A» als für die von CP. Wahrscheinlich haben sie auch geringere Affinitäten für die SYN-Bindungsstelle. Jedoch ist es sehr schwierig, direkte Messungen zu interpretieren, da die SYN-Bindungsstelle normalerweise blockiert ist, außer wenn das CP-Gen gerade übersetzt wird. Soweit man weiß, bewegen sich nur etwa 10% der Ribosomen, die entlang des CP-Gens gewandert sind, weiter zum SYN-Gen. Gleich wichtig oder noch wichtiger als Kontrollmechanismus ist, daß neu synthetisierte CP-Moleküle sich spezifisch an die SYN-Bindungsstellen anheften und *in vivo* eine weitere Translation des SYN-Gens verhindern können (Abbildung 15-21). Dadurch wird die weitere Synthese der Synthetase 10 Minuten nach Infektion blockiert. Die CP-Untereinheit muß daher als ein spezifischer Repressor auf der Translationsebene angesehen werden.

Es ist offensichtlich sinnvoll, die Synthese der Synthetase nach der ersten Hälfte des Vermehrungszyklus zu beenden. Zu diesem Zeitpunkt hat sich nämlich eine für die Virus-RNA-Replikation ausreichende Menge von Enzym angesammelt und der wesentliche Vorgang in der zweiten Hälfte des Vermehrungszyklus ist die Synthese viraler Strukturproteine.



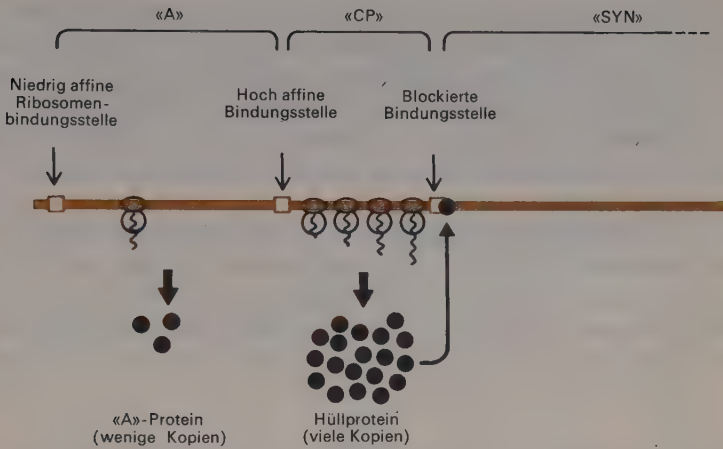


ABBILDUNG 15-21 Bindung eines Hüllproteinmoleküls an die Initiierungsstelle des SYN-Gens.

### SYNTHESE BIOLOGISCH AKTIVER Q $\beta$ -RNA IM REAGENZGLAS

Kürzlich gelang die Synthese eines biologisch aktiven RNA-Phagenchromosoms im Reagenzglas. Zellen, die mit dem Phagen Q $\beta$  infiziert worden waren, dienten als Quelle für das Enzym RNA-Synthetase. Der Erfolg hing von der sorgfältigen Reinigung des Enzyms ab, wodurch es von verunreinigenden Nukleasen befreit wurde. Unter Verwendung des parentalen «+»-Stranges bildet dieses Enzym zuerst einen «-»-Strang, wodurch eine doppelsträngige Replikationszwischenstufe entsteht (Abbildung 15-22). Es scheint nun so, als ob die doppelsträngige Zwischenstufe aus irgendwelchen Gründen instabil

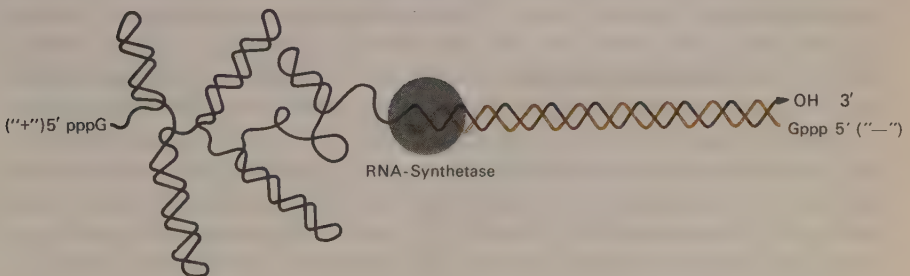


ABBILDUNG 15-22 Schematische Darstellung der Synthese eines «-»-Stranges an einem parentalen «+»-Strang von Q $\beta$ .

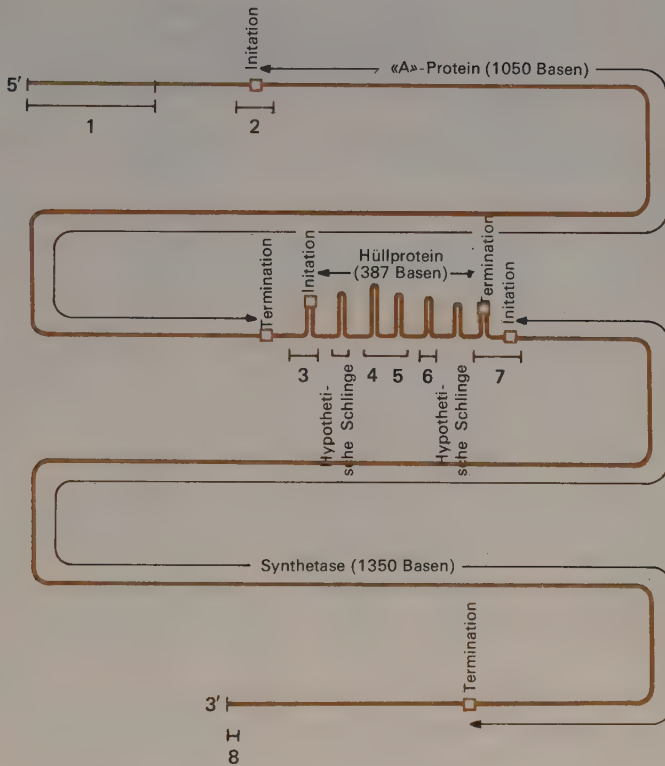
wäre und im allgemeinen in freie «+»- und «-»-Stränge zerfiel. Diese dienen wiederum als Matrizen für weitere «+»- und «-»-Stränge. Sowohl «+»- wie «-»-Stränge werden in Richtung von 5' nach 3' unter Verwendung von Ribonukleosidtriphosphaten als Vorstufen synthetisiert. Es werden wesentlich größere Mengen von «+»-Strängen als von «-»-Strängen gemacht. Das könnte ein Hinweis dafür sein, daß die RNA-Synthetase bevorzugt an das 3'-Ende des Q $\beta$  «-»-Stranges bindet.

Die im Reagenzglas synthetisierten «+»-Stränge sedimentieren mit der gleichen Geschwindigkeit wie *in vivo* synthetisierte Stränge und zeigen die gleiche Infektiosität für wachsende Bakterien. Die Häufigkeit mit der Mutanten auftreten ist der unter natürlichen Bedingungen außerdem ähnlich. Das bedeutet, daß *in vitro* ebenso genau kopiert wird wie in der Zelle.

#### AUSSICHT AUF BALDIGE AUFKLÄRUNG DER KOMPLETTEN NUKLEOTIDSEQUENZEN VON Q $\beta$ UND R17

Viele Jahre hindurch glaubte fast niemand daran, daß die gesamte Nukleotidsequenz eines Virus aufgeklärt werden könnte. Die Zahl der Nukleotide schien einfach zu groß, um das Problem überhaupt anzugehen. Eine Vielfalt neuer Methoden zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen hat diese Einstellung radikal geändert. Es half außerdem sehr, daß viele der erhaltenen Nukleotidsequenzen durch die Aminosäuresequenzen, die sie voraussagen, überprüft werden konnten. Somit ist es im Bereich des Möglichen, daß die komplette Sequenz von R17 und Q $\beta$  innerhalb der nächsten zwei bis drei Jahre bekannt sein wird. Die Sequenz der ersten 150 Q $\beta$ -Nukleotide und die der ersten 80 R17-Nukleotide wurde bereits ausgearbeitet; einem endgültigen Erfolg scheint daher kein wirkliches Hindernis mehr im Wege zu stehen, das nicht durch konsequente Arbeit überwunden werden könnte. Ein sehr wichtiger neuer experimenteller Trick besteht darin, RNA-Synthetase für verschiedene Zeiten wirken zu lassen, wodurch unvollständige Ketten zunehmender Länge entstehen. Diese Technik erlaubt die leichte Einordnung vieler Polynukleotidfragmente, die durch begrenzten enzymatischen Abbau entstehen. Für die Sequenzanalyse hat sich auch die Fähigkeit verschiedener Nukleasen, intakte Ketten spezifisch in kleinere Stücke definierter Größe zu spalten, als sehr hilfreich erwiesen. Häufig entsteht bei der ersten Spaltung ein Stück, das 40% des Gesamtmoleküls ausmacht und das 5'-Ende enthält und ein zweites Stück, das aus 60% und dem ursprünglichen 3'-Ende besteht. Dadurch wurde zum ersten Mal klar, daß das CP-Gen nicht das 5'-endständige Gen sein kann.

Zusätzlich zur Anordnung der Gene wurden bereits weitere wichtige Resultate erzielt (Abbildung 15-23). Erstens wurde klar, daß die Translation



**ABBILDUNG 15-23** Genkarte von R17 auf der Nukleotidebene (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

nicht unmittelbar am 5'-Ende beginnen muß und daß viele endständige Nukleotide keine Codierungsfunktion haben. Das erste in Frage kommende Q $\beta$ -AUG-Triplett befindet sich in Position 60, aber die nachfolgenden Nukleotide codieren nicht die ersten Aminosäuren des «A»-Proteins. Sein Anfangspunkt muß daher an einem weiter innen liegenden AUG-Codon zu suchen sein. Zweitens findet man das Kettenabbruchsignal nicht genau am 3'-Ende, sondern es muß vom Ende durch mindestens 20 Nukleotide getrennt sein. Man nimmt heute an, daß Nukleotide, die dem 5'- und 3'-Ende unmittelbar benachbart sind, eine spezifische Aufgabe bei der Erkennung der Virus-spezifischen RNA-Synthetase haben. Beide Enden müssen Information für die Bindung der Synthetase tragen, da die gleichen Enzymmoleküle sowohl den «+»- wie den «-»-Strang replizieren. Das bedeutet, daß die 3'-Enden des «+»- und des «-»-Stranges sehr ähnlich sein müssen und





daß daher das 5'-Ende des «+»-Stranges, an dem das 3'-Ende des «-»-Stranges gemacht wird, eine Sequenz enthalten muß, die praktisch der des 3'-Endes komplementär ist.

### **SATELLITEN-RNA CODIERT NUR HÜLLPROTEINMOLEKÜLE**

Noch kleinere RNA-Viruspartikeln findet man in Tabakpflanzenzellen, die mit einem Tabak-Nekrose-Virus infiziert wurden. Ihre einzelsträngigen Nukleinsäureketten enthalten ca. 1000 Nukleotide, gerade genug, um die Proteinkomponente zu codieren, die als Strukturprotein die Hülle ausmacht. Diese winzigen Partikeln, die oft als Satelliten bezeichnet werden, werden nie alleine gefunden; sie werden nur gemacht, wenn die betroffenen Zellen gleichzeitig mit einem anderen, größeren RNA-Virus (6000 Nukleotide) infiziert werden. Das deutet darauf hin, daß die RNA dieses besonders kleinen Virus unter Verwendung Virus-spezifischer Enzyme (besonders der RNA-Synthetase) synthetisiert wird, die durch die RNA der größeren Partikel codiert werden. Die Frage, ob man diese Partikeln als die kleinsten bekannten Viren betrachten soll, ist daher etwas willkürlich und wahrscheinlich auch nicht besonders wichtig. Wichtig ist dagegen sicherlich die Tatsache, daß ihre Nukleinsäureketten besonders gute Studienobjekte für weitere Sequenzuntersuchungen darstellen.

### **NOCH KLEINERE ALS DIE SCHON BEKANNTEN KLEINSTEN VIREN SIND KAUM MÖGLICH**

Die Notwendigkeit, normalerweise eine Virus-spezifische RNA-Synthetase und auch noch eine Proteinhülle zu codieren, setzt der Größe eines RNA-haltigen Virus praktisch eine untere Grenze. Erstens wäre es überraschend, wenn ein Synthetasmolekül, das ein wesentlich geringeres Molekulargewicht als 30.000 hätte, alle Aufgaben bei der Selbstreplikation der RNA erfüllen könnte. Zweitens kann man sich schwer stabile Hüllproteinuntereinheiten vorstellen, die aus weniger als 50-75 Aminosäuren bestehen. Das kleinste vollständige RNA-Virus, das es überhaupt geben kann, enthält daher höchstwahrscheinlich mindestens 1500 Nukleotide (die Hälfte von R17). Irgendeine kleinere Partikel zu erwarten scheint höchst unrealistisch.

Über die unterste Grenze eines DNA-Virus kann man noch keine ähnlichen Überlegungen anstellen, da es möglich ist, daß ein zirkuläres virales DNA-Molekül unter ausschließlicher Verwendung von Wirtsenzymen repliziert werden könnte. In diesem Fall könnte man eines Tages ein DNA-Virus entdecken, dessen einziges Gen sein Hüllprotein codiert. Es wäre anzunehmen, daß solch eine DNA-Kette nur 300-500 Basenpaare enthält.

Es ist viel schwieriger, vernünftige Schätzungen über die obere Grenze der Größe eines Virus anzustellen. Die größten heute bekannten Viren enthalten etwa 200-300 Gene, aber es scheint keinen theoretischen Grund zu geben, weshalb nicht eine viel größere Zahl vorliegen sollte. Vielleicht besteht jenseits einer bestimmten Größe kein wesentliches Bedürfnis für neue Gene zur Beeinflussung der Wirtszelle zugunsten viraler Produkte.

In jedem Fall ist der absolute Unterschied zwischen einem Virus und einer Zelle völlig eindeutig. Noch vor 10 Jahren herrschte diesbezüglich große Verwirrung. Das hauptsächliche Kriterium für ein Virus war damals immer noch, daß es Membranfilter passieren kann, die Bakterien zurückhalten. Nach dieser Definition wurden sehr kleine Krankheitserreger, die sogenannten Rickettsien, im allgemeinen wie Viren behandelt. Man hat aber mittlerweile gefunden, daß sie sowohl DNA und RNA als auch ein Protein-synthetisierendes System enthalten, wodurch sie als Bakterien zu erkennen sind. Das Wesen eines Virus besteht daher darin, daß ihm Protein-synthetisierende Systeme fehlen. Bei ihrer Vermehrung muß daher immer die umgebende schützende Hülle abgebaut werden, damit ihre Chromosomen mit zellulären Enzymen in Kontakt kommen können.

### ES GIBT EINE UNTERE GRENZE FÜR DIE GRÖSSE SICH TEILENDER ZELLEN

Es folgt daher, daß es eine untere Grenze für eine sich teilende Zelle gibt, sogar wenn sie in einer Umgebung wächst, die alle benötigten kleinen Moleküle enthält. Sie muß groß genug sein, um eine funktionsfähige semipermeable Membran, einen Protein-synthetisierenden Apparat und ausreichendes genetisches Material zu haben, um die verschiedenen Enzyme zu codieren, die für die Synthese der nötigen Proteine und Nukleinsäurekomponenten gebraucht werden. Zusätzlich müssen ihre Chromosomen Information für diejenigen Enzyme enthalten, die für die Synthese der kleinen Moleküle notwendig sind, die nicht durch die semipermeable Zellmembran transportiert werden können. Während z.B. Aminosäuren, Purine und Pyrimidine den meisten Zellen als Nahrung zur Verfügung gestellt werden können, ist das für phosphorylierte Verbindungen wie z.B. ATP gewöhnlich nicht der Fall. Ihre Biosynthese muß im allgemeinen innerhalb der Zellen stattfinden und es muß daher Gene für die Enzyme geben, die für ihren Aufbau aus ihren kleineren Purin- und Pyrimidinbausteinen gebraucht werden. Man kann die untere Grenze für die Größe einer Zelle noch nicht exakt angeben. Die Menge von DNA in Rickettsien ist noch nicht genau bekannt, aber eine vorsichtige Schätzung wäre, daß ein Rickettsien-Chromosom 15-20% der DNA eines *E. coli* Chromosoms besitzt. Es enthält daher wahrscheinlich zwischen 750 und 1000 Gene. Es gibt Berichte über noch kleinere Zellen,

aber solche Aussagen müssen mit größtem Vorbehalt betrachtet werden, da sie an sich bedeuten würden, daß nur 100 verschiedene Proteine ausreichen würden, um den Zustand des Lebens aufrecht zu erhalten.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Alle bekannten Viren enthalten ein Nukleinsäure-Core (entweder DNA oder RNA), das von einer Schutzhülle umgeben ist, die immer Protein und in manchen komplizierteren Fällen auch Lipide oder Kohlenhydrate (oder beide) enthält. Die virale DNA kann entweder einzelsträngig oder doppelsträngig sein. Ebenso gibt es auch einzelsträngige und doppelsträngige RNA-Viren. Das Vorkommen von Nukleinsäure ist nicht überraschend, da ja eine genetische Komponente vorhanden sein muß. Was jedoch zuerst überraschend scheint ist, daß RNA die genetische Komponente vieler Viren (z.B. Tabakmosaikvirus, und Influenza) ist. Das bedeutet, daß virale RNA-Moleküle als Matrize für ihre eigene Synthese dienen können.*

*Nachdem die Virusnukleinsäure in eine Wirtszelle eingedrungen ist, kommt es zur Synthese sowohl Virus-spezifischer Nukleinsäuren als auch der spezifischen Komponenten, die man in der schützenden Virushülle findet. Diese Komponenten aggregieren dann spezifisch unter Bildung neuer infektiöser Viruspartikeln, die identisch mit den infizierenden parentalen Partikeln sind. Die selektive Synthese von Virusbestandteilen in einer Wirtszelle wird oft durch die vorherige Synthese Virus-spezifischer Enzyme unterstützt, die am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt sind. So benötigt z.B. die Vermehrung einzelsträngiger RNA die Anwesenheit von RNA-Synthetase. Dieses Enzym wandelt das infizierende einzelsträngige RNA-Molekül in ein doppelsträngiges Molekül um. Man betrachtet es heute als wahrscheinlich, daß die grundlegenden Regeln der Duplikation von RNA-Molekülen denen der DNA gleich sind. In allen Fällen entstehen neue Polynukleotidstränge durch die Bildung komplementärer Kopien, unter Verwendung DNA-ähnlicher Basenpaarungen.*

*Das Auftreten spezifischer Proteine von DNA-Viren zum richtigen Zeitpunkt während des Vermehrungszyklus wird manchmal durch die Anordnung ihrer Gene auf den entsprechenden Operons kontrolliert. Von wesentlicher Bedeutung ist auch die Verwendung Virus-spezifischer  $\sigma$ -Faktoren, um neue Operons zu bestimmten Zeiten zur Funktion zu bringen. Im allgemeinen sind Repressor-Operator-Systeme für die lytische Vermehrung von Viren nicht wichtig. Im Gegensatz dazu wird der lysogene Zustand direkt durch spezifische Repressoren kontrolliert.*

*Die einfachsten heute bekannten Viren sind die RNA-Phagen. Auf ihren Chromosomen 3300 Nukleotide lange sind drei hauptsächliche Gene angeord-*



net, von denen zwei Strukturproteine und das dritte RNA-Synthetase codieren. Die Funktionsgeschwindigkeit dieser Gene wird teilweise durch die Verfügbarkeit ihrer Bindungsstellen für Ribosomen (Initiationsstellen) kontrolliert. Ein weiterer wichtiger Kontrollmechanismus ist die spezifische Bindung neu-synthetisierter Hüllproteinmoleküle an die Initiationsstelle des Synthetasegens, wodurch die Funktion des Synthetasegens während der zweiten Hälfte des Lebenszyklus des Virus verhindert wird. Neue Methoden für die Nukleotidsequenzanalyse sollten die Ausarbeitung der vollständigen Nukleotidsequenz mehrerer RNA-Phagenchromosomen bald ermöglichen.

## LITERATUR

- Crick, F. H. C., und J. D. Watson, «Virus Structure: General Principles», *Ciba Found. Symp. Nature Viruses*, **1957**, 5-13. Eine frühe Darstellung, die die strukturellen Konsequenzen des begrenzten Nukleinsäuregehaltes von Viren erklärt.
- Fraenkel-Conrat, H., *Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses*, Academic, New York, 1962. Eine Einführung in einige einfache Vorstellungen über TMV. (Taschenbuch).
- Klug, A., und D. L. D. Caspar, «The Structure of Small Viruses», *Advan. Virus Res.*, **7**, 225 (1960). Eine großartige Darstellung der Prinzipien des Virusaufbaus, mit besonderer Betonung des TMV.
- Stent, G. S., *Molecular Biology of Bacterial Viruses*, Freeman, San Francisco, 1963. Enthält, neben anderen positiven Aspekten, eine sehr klare Diskussion der Rolle, die Virus-spezifische Enzyme spielen.
- Luria, S. E., und J. E. Darnell, *General Virology*, 2. Aufl. Wiley, New York, 1968. Eine intelligente Abhandlung über alle Aspekte der Virusvermehrung.
- Fenner, F., *The Biology of Animal Viruses*, Academic, New York, 1968. Eine gründliche zwei-bändige Abhandlung vom biologischen Gesichtspunkt über Animalviren.
- Cohen, S. S., *Virus Induced Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1968. Eine vollständige und eigenwillige Zusammenfassung darüber, wie Viren spezifische Enzyme dafür einsetzen, die zelluläre Synthese auf Virusproduktion umzustellen.
- Wood, W. B., und R. S. Edgar, «Building a Bacteria Virus». Ein sehr schön illustrierter Artikel aus dem *Scientific American*, der in *Molecular Basis of Life*, R. H. Haynes und P. C. Hanawalt (Eds.) Freeman, San Francisco, 1968 abgedruckt ist.
- Molecular Basis of Virology*, H. Fraenkel-Conrat (Ed.), Reinhold. New York, 1968. Eine ausgezeichnete Serie von Übersichtsartikeln über alle Arten von Viren, unter Betonung der molekularen Aspekte.
- Roberts, J. W., «Termination Factor for RNA Synthesis», *Nature*, **224**: 1168 (1969), Wie die Entdeckung des Terminationsfaktors  $\rho$  gleichzeitig zur Idee des Antiterminationsfaktors führte.
- Travers, A. A., «Positive Control of Transcription by a Bacteriophage», *Nature*, **225**: 1009 (1970). Elegante Versuche, die die Beteiligung eines T4-spezifischen  $\sigma$ -Faktors an der Synthese früher T4-mRNA zeigen.



- Schmidt, D. A., A. J. Mazaitis, T. Kasai und E. K. F. Bautz, «Involvement of a Phage T4  $\sigma$ -Factor and an Antiterminator Protein in the Transcription of Early T4 Genes *in vivo*», *Nature*, **225**: 1012 (1970). Der Vermehrungszyklus von T4, in bezug auf  $\sigma$ ,  $\rho$  und Antiterminationsfaktoren ideenreich analysiert.
- «Transcription of Genetic Material», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35** (1970). Praktisch alles, was bis Juni 1970 über die Transkription viraler Gene bekannt war, ist in dieser äußerst umfassenden Sammlung von Veröffentlichungen enthalten.

# 16

## MOLEKULAR- BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER EMBRYOLOGIE

Der sorgfältige Leser wird festgestellt haben, daß viele Behauptungen in den vorhergehenden Kapiteln mit Einschränkungen gemacht wurden; wir wissen weniger darüber, wie Bakterienzellen die Synthese spezifischer Proteine kontrollieren als über die Mechanismen der Proteinsynthese, und noch viel weniger als über die Struktur der DNA. Man kann zwar eindeutig sagen, daß die genetische Information zellulärer Chromosomen in der Nukleotidsequenz der DNA-Moleküle ruht und es ist fast sicher, daß alle tRNA-Moleküle zu einer Kleeblattstruktur gefaltet sind, aber es ist völlig ungewiß, ob sich herausstellen wird, daß die Mehrheit der Operons dem Beispiel des Lactose-Operons folgen und durch Repressoren kontrolliert werden oder ob positive Kontrollsysteme die Regel sind. Diese Ungewissheiten stören uns jedoch nicht ernstlich. Wir können mit gutem Grund annehmen, daß sich innerhalb der nächsten Jahre der größte Teil unserer Spekulationen über Kontrollmechanismen bei Bakterien zu Tatsachen verdichten werden.

Man darf sich jedoch durch die Erfolge der Vergangenheit nicht zu der kritiklosen Behauptung verleiten lassen, daß die Erkenntnisse, die mit Bakterien auf molekularer Ebene gewonnen wurden, sich automatisch auf Zellen höherer Pflanzen und Tiere ausweiten lassen; man muß sich nur daran erinnern, daß Bakterien und Viren wegen ihrer Einfachheit gewählt wurden, daß höhere Pflanzen und Tiere jedoch äußerst komplexe Studienobjekte sind und daß man sehr sorgfältig abwägen

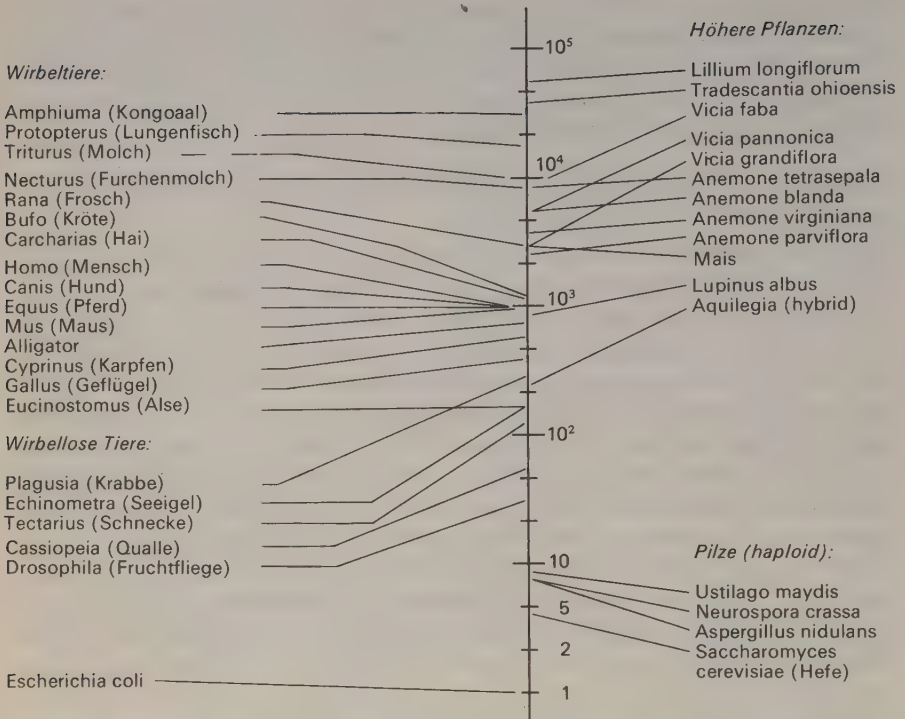
muß, welche genetischen Vorgänge in höheren Organismen innerhalb der nächsten 10 - 20 Jahre auf molekularer Ebene erfolgreich untersucht werden können. Man sollte sich im speziellen fragen, ob wir zum gegenwärtigen Zeitpunkt schon ausreichende Grundlagen haben, um molekularbiologische Fragen der Embryologie anzugehen.

#### DIE MENGE VON DNA PRO ZELLE STEIGT VON *E. COLI* ZU SÄUGETIEREN CA. UM DAS ACHTHUNDERTFACHE

Bevor erfahrene Bergsteiger einen Berg besteigen, messen sie sorgfältig seine Höhe und versuchen abzuschätzen, wie schwierig die Besteigung sein wird. Genauso wäre es äußerst praktisch zu wissen, um wieviele - genetisch gesprochen - die Säugetierzelle komplizierter ist als die *E. coli* Zelle. Ein offensichtlicher Ansatzpunkt wäre, den Gehalt an DNA in einer Säugetierzelle zu bestimmen; die Antwort (Tabelle 16-1) ist, daß er ungefähr 800 mal so viel ist wie in *E. coli*. Dieser Wert ergibt eine *obere Grenze* für die Zahl der verschiedenen Gene, da kein Grund dafür besteht, daß die Größe von Proteinen und damit die Gengröße von niederen zu höheren Lebensformen zunimmt. Unter der Annahme, daß jedes Gen nur in einer Kopie pro haploidem Genom vorliegt, wäre eine Säugetierzelle also fähig, über zwei Millionen verschiedene Proteine zu synthetisieren. In diesem Fall wäre die Aufgabe, eine gegebene Mutanteneigenschaft mit einem spezifischen Mutantenprotein in Beziehung zu bringen bei weitem schwieriger als bei Bakterien.

In einigen Fällen ist jedoch die Menge von DNA sicherlich irreführend. Es gibt Gruppen von Amphibien, deren Zellen 25 mal mehr DNA enthalten als Säugetierzellen. Jedoch gibt es hier keinen offensichtlichen Grund zu der Annahme, daß auch eine größere biologische Komplexität vorliegt. Man vermutet statt dessen, daß viele dieser Amphibiengene in sehr vielen identischen Kopien vorliegen. Wenn jedoch Gen-Redundanz eine allgemeine Eigenschaft von Amphibien-Chromosomen ist, dann könnten auch viele Säugetiergene vielfach vorhanden sein. Tatsächlich werden wir weiter unten sehen, daß das sehr wahrscheinlich der Fall ist.

Man muß daher sehr vorsichtig sein, wenn man den DNA-Gehalt unmittelbar mit der Zahl der verschiedenen Proteine in Beziehung bringen will, die in einer gegebenen Zelle synthetisiert werden können. Trotzdem zeigt eine bloße morphologische Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop, daß es in Wirbeltierzellen eine wesentlich größere Verschiedenheit subzellularer Strukturen gibt als in *E. coli*. Man muß deshalb eine entsprechend größere Zahl von Strukturproteinen und Enzymen, die für ihren Aufbau und ihre Funktion notwendig sind, erwarten. Es wäre überraschend, wenn die Wirbeltierzelle nicht genetisch mindestens 25 - 50 mal komplexer als *E. coli* wäre.



**ABBILDUNG 16-1** Haploide DNA-Mengen in verschiedenen Zellen, ausgedrückt als Vielfaches der Menge, die man in *E. coli* findet ( $4 \times 10^{12}$  mg =  $2,4 \times 10^9$  MG). Viele dieser Werte sind nur als approximativ zu betrachten [Nachzeichnung nach Holliday, Sym. Soc. Gen. Microbiol. 20: 362 (1970)].

## KONZENTRATION AUF ORGANISMEN MIT LEICHT ZU BEOBACHTENDER SPALTUNGSTEILUNG

Die Mechanismen, durch die sich ein befruchtetes Ei zu einem vielzelligen Organismus entwickelt, waren für die Biologen fast 100 Jahre lang eine ständige Quelle der Verwunderung. Während dieser Zeit konzentrierten sich experimentelle Untersuchungen auf Echinodermen (besonders die Seeigel) und Amphibien (besonders verschiedene Frösche, Salamander und Kröten). Der Grund für solche Einseitigkeit lag darin, daß man sich die Eier der Echinodermen und Amphibien leicht beschaffen, sie befruchten lassen und anschließend beobachten konnte, während sie ihre üblichen Entwicklungsstadien durchliefen. Im Gegensatz dazu ist es viel schwieriger, mit Vögeln und Säugetieren zu arbeiten, bei denen die gesamten embryolo-



gischen Stadien im Ei oder im weiblichen Elternteil ablaufen. Erst kürzlich wurde ein echter Fortschritt dadurch erreicht, daß die frühen Stadien der Mausembryogenese experimentellen Eingriffen zugänglich gemacht wurden.

Eine wesentliche Eigenart sowohl der Seeigel als auch der Froschembryologie liegt darin, daß alle Nahrungsstoffe (hauptsächlich im Dotter gespeichert), die für die Entwicklung während des Blastula- und Gastrulastadiums notwendig sind (Abbildung 16 - 2), im unbefruchteten Ei vorhanden sein müssen. Erst wenn der sich entwickelnde Embryo fähig ist, sich selbst zu ernähren, was beim Frosch z.B. im Kaulquappenstadium erreicht wird, findet wirkliches Massenwachstum statt. Die Eier von Echinodermen und Amphibien sind daher im Vergleich zu den Zellen des erwachsenen Tieres sehr, sehr groß und die Zellteilungen, die nach der Befruchtung stattfinden, führen zu immer kleiner werdenden Zellen. Daher kommt der Name Spaltungsteilung. Frühe Spaltungsteilungen laufen in rascher Folge ab, die durch kurze Perioden der Interphase charakterisiert sind, während welcher die DNA-Synthese mit stark beschleunigter Geschwindigkeit abläuft: die DNA-Menge in jedem der 1000 oder mehr kleinen Tochterzellkerne einer Gastrula ist dieselbe wie die in den Kernen eines kürzlich befruchteten-Eies.

#### **DAS KERNPROBLEM DER EMBRYOLOGIE IST DIE ZELLDIFFERENZIERUNG**

Die Spaltungsteilungen führen natürlich nicht an sich zu einer Entwicklung des Embryos. Das eigentliche Wesen dieser Entwicklung liegt statt dessen in einem Prozeß der Zelldifferenzierung. Alle höheren Pflanzen und Tiere bestehen aus einer großen Vielfalt verschiedener Zelltypen (z.B. Nervenzellen, Muskelzellen, Schilddrüsenzellen, Blutzellen), die in geregelter Weise entstehen müssen. Bei einigen Organismen beginnt die Spezialisierung bereits mit den ersten wenigen Zellteilungen nach der Befruchtung. Bei anderen Organismen findet eine große Zahl von Zellteilungen statt, bevor irgendeine Nachkommenzelle in ihr Schicksal festgelegt wird. Unabhängig von dem genauen Zeitpunkt, zu dem die Differenzierung eintritt, führt sie jedoch immer zu einer Umwandlung der parentalen Zelle in eine große Zahl morphologisch verschiedener Zelltypen bei der Nachkommenschaft.

Die Differenzierung kann von drei Gesichtspunkten aus betrachtet werden. Erstens: welcher Art sind die äußeren Kräfte, die auf die ursprünglich undifferenzierte Zelle einwirken und eine Kette von Vorgängen auslösen können, welche zu zwei Tochterzellen verschiedener Konstitution führt? In manchen Fällen kann man sich leicht vorstellen, daß asymmetrisch wirkende äußere Kräfte vorliegen. So zwingt z.B. die Schwerkraft den Dotter eines befruchteten Amphibieneies nach unten. Es haben daher nach den

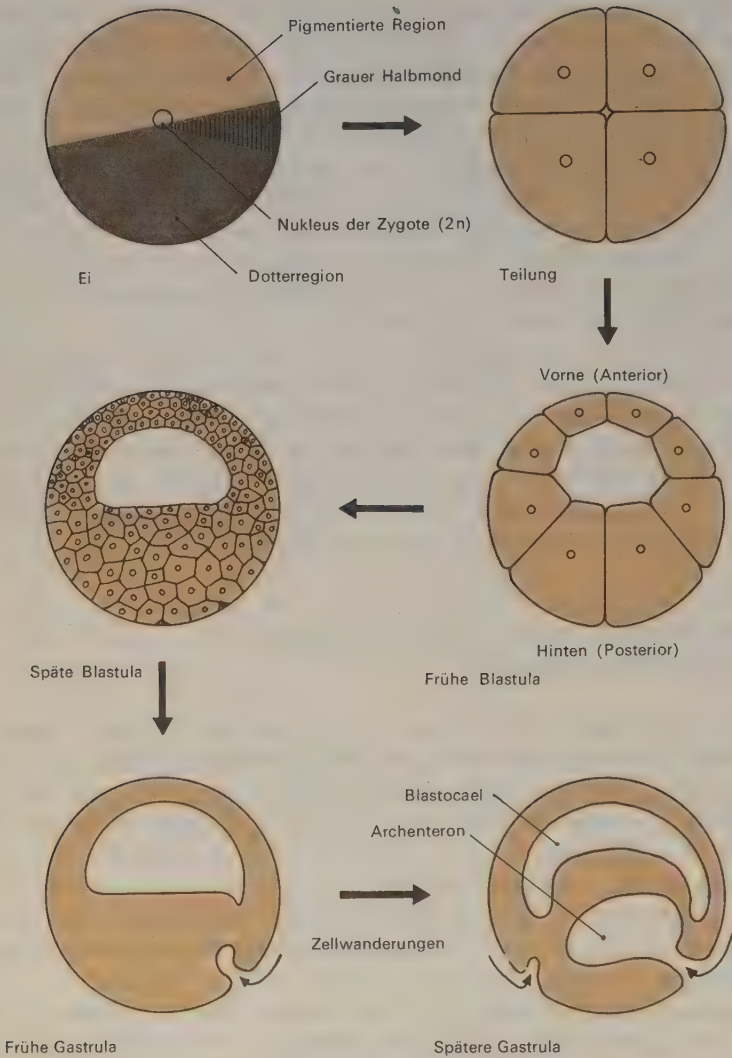


ABBILDUNG 16-2 Frühe Stadien in der Entwicklung eines Amphibieneies.

ersten paar Zellteilungen einige der Nachkommenschaftszellen mehr Dotter als andere.

Man kann die Differenzierung zweitens auch so analysieren, daß man fragt, welche molekularen Unterschiede es zwischen differenzierten Zellen

gibt. Sind diese Unterschiede extrem oder kommt es zu den morphologischen Unterschieden aufgrund der Anwesenheit einiger weniger einzigartiger Proteine in abnorm großen Mengen? Alle bisherigen Befunde deuten auf die erstere Möglichkeit: jede Art von differenzierter Zelle enthält viele verschiedenen Moleküle, die auf den Zelltyp beschränkt sind. Die vollständige Beschreibung der Differenzierung auf molekularer Basis wäre deshalb notwendigerweise eine äußerst schwierige Aufgabe.

Drittens kann man fragen, ob die verschiedenen Veränderungen, die zur Differenzierung führen, irreversibel sind und, falls das so sein sollte, wie sie weiter vererbt werden. Die Beantwortung dieser Fragen war immer ein Hauptziel der meisten Biologen. Bis vor kurzen wurde die Embryologie als unabhängiges Wissensgebiet untersucht, getrennt von modernen genetischen und biochemischen Vorstellungen. Heute ist jedoch klar, daß die morphologischen Mittel der klassischen Embryologen keine befriedigenden Antworten geben können. Wie in der Genetik, müssen statt dessen auch hier die grundlegenden Antworten auf molekularer Ebene gesucht werden. Die Parallele zur modernen Genetik mag in der Tat sehr weitgehend sein, da die Embryologen heute glauben, daß viele der grundlegenden Kontrollmechanismen, die die möglichen chemischen Reaktionen einer Zelle festlegen, auf der Ebene des Gens einsetzen. Neue methodische Fortschritte, die gewisse Aspekte der Biochemie und der Genetik ununterscheidbar gemacht haben könnten daher rasch auch auf die Entwicklungsbiologie übergreifen. Wir müssen hier jedoch auf eine sehr beunruhigende Tatsache hinweisen: im Vergleich zu höheren Organismen wie *Drosophila* oder Maus, weiß man fast überhaupt nichts über die Genetik des Seeigels und fast ebenso wenig über die von Fröschen, Salamandern und Kröten.

## DIE DIFFERENZIERUNG IST HÄUFIG IRREVERSIBEL

Es ist heute möglich, eine große Varietät differenzierter Zellen zu isolieren, und sie (wie Bakterien) außerhalb lebender Organismen unter wohl definierten Nährstoffbedingungen wachsen zu lassen. Diese Technik der «Gewebekultur» erlaubt es uns z.B. die Frage zu untersuchen, ob eine Nervenzelle auch weiterhin wie eine Nervenzelle aussieht, wenn sie außerhalb ihrer normalen zellulären Umgebung wächst. Die Antwort ist in diesem Falle ja. Etwas ist passiert, das für immer die Fähigkeit der Zelle, andere Proteine als die einer Nervenzelle zu synthetisieren, zerstört hat. Ähnliche Ergebnisse erhält man auch, wenn man viele andere Zelltypen höherer Tiere untersucht. Bei höheren Pflanzen findet man jedoch häufiger das Gegenteil. Aus hoch differenzierten Wurzel- oder Epidermalzellen kann man häufig wieder eine vollständige Pflanze heranzüchten.

## **DIE DIFFERENZIERUNG IST IN ALLGEMEINEN NICHT AUF GEWINN ODER VERLUST EINES CHROMOSOMS ZURÜCKZUFÜHREN**

Eine offensichtliche Möglichkeit, die irreversible Differenzierung zu erklären, ist, daß nur ein Bruchteil der Gene des befruchteten Eies an eine Nervenzelle usw. weitergegeben wird. Diese Hypothese scheint jedoch falsch zu sein. Soweit man weiß, enthalten alle Zellen der meisten Organismen ungefähr die gleiche Chromosomenzahl; eine offensichtliche Ausnahme von dieser Regel sind die haploiden Geschlechtszellen. Praktisch allen Zellteilungen geht eine normale Mitose voraus, sodaß Tochterzellen im allgemeinen identische Chromosomensätze erhalten. Man kann jedoch nicht sagen, daß an einem individuellen Gen keine permanenten Veränderungen eingetreten sind. Es bleibt die Frage, ob es möglich ist, spezifische Gene selektiv zu mutieren, wodurch sie funktionslos (oder funktionsfähig) würden. Das Problem ist, geeignete Methoden zur Untersuchung dieser Möglichkeit zu finden. Leider scheint diese Aufgabe im Augenblick äußerst schwierig.

## **MULTIZELLULÄRE ORGANISMEN MÜSSEN KONTROLLIEREN KÖNNEN, ZU WELCHEM ZEITPUNKT GENE AKTIV SIND**

Unabhängig von der Art des molekularen Mechanismus (z.B. ob chemische Veränderungen am Gen selbst stattfinden), gibt es nun gute Hinweise dafür, daß in multizellulären Organismen, ebenso wie in Bakterien, nicht alle Gene einer Zelle zum gleichen Zeitpunkt funktionsfähig sind. Irgendetwas muß z.B. einer Muskelzelle befehlen, nur die verschiedenen Proteine zu synthetisieren, die für den Aufbau einer Muskelfaser notwendig sind.

Man wird aber die Embryologie eigentlich erst dann verstehen, wenn man versteht, wie Gene selektiv funktionieren. Außerdem muß man nicht nur fragen, was zwei Tochterzellen dazu veranlaßt, verschiedene Proteine zu synthetisieren, sondern auch warum sie dann ausschließlich diese gleiche Gruppe von Proteinen weiter synthetisieren. Wenn man das Problem in dieser Weise formuliert, wird klar, daß niemand je in der Lage sein wird, *alle* chemischen Details im Verlauf der Embryonalentwicklung einer höheren Pflanze oder eines Tieres auszuarbeiten. Sogar ein bescheidener Versuch zu einem umfassenden Verständnis würde ja die Untersuchung des Verhaltens hunderter verschiedener Proteine erfordern. Trotzdem sagt uns unser gesunder Menschenverstand, daß, wie bei Bakterien, auch hier einige allgemeine Prinzipien, die das selektive Auftreten spezifischer Proteine regeln, vorhanden sein könnten. Zum Beispiel könnte ein gewisser Grad von Differenzierung auf der Ebene des Chromosoms stattfinden, aufgrund von Mechanismen, die die Menge von spezifischer mRNA-Synthese kontrol-



lieren. Tatsächlich gibt es sehr gute Hinweise (siehe unten) für eine unterschiedliche Synthesegeschwindigkeit der RNA entlang verschiedener Regionen vieler Chromosomen. Noch wichtiger ist, daß Regionen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv sind, häufig während anderer Entwicklungsstadien inaktiv bleiben.

Eine wachsende Zahl von Embryologen beginnt sich nun zu fragen, ob die grundlegenden Kontrollmechanismen negativer Natur sind, wie der Lactose-Repressor, oder positiver Natur, wie die spezifischen viralen Sigma ( $\sigma$ )-Faktoren. Leider steht man vor der Schwierigkeit, daß die meisten Charakteristika, die die Embryologen untersuchen, vom chemischen Gesichtspunkt aus hoffnungslos komplex sind (z.B. das Auge); nur wenige können mit dem Auftreten wohldefinierter chemischer Reaktionen in Verbindung gebracht werden. So ist zum Beispiel fast nichts über die Struktur der Nervenzellen auf molekularer Ebene bekannt, obwohl sie aufgrund morphologischer Kriterien leicht zu identifizieren sind; nicht ein Proteinmolekül des Nervengewebes ist gut charakterisiert. Obwohl wir mit einigen Muskelproteinen etwas besser vertraut sind, werden trotzdem unsere primitiven Kenntnisse der chemischen Details eine Analyse der genauen Beziehung zwischen Gen und Protein wahrscheinlich zu einer äußerst trickreichen Aufgabe machen.

### **ES IST NOTWENDIG, EINFACHE MODELLSYSTEME ZUM STUDIUM DER DIFFERENZIERUNG ZU FINDEN**

Man muß sich fragen, ob zum gegenwärtigen Zeitpunkt irgendeines der embryologischen Differenzierungssysteme überhaupt ernsthaft untersucht werden kann. Erstens muß man sich darüber im klaren sein, daß eine bloße Katalogisierung offensichtlicher Unterschiede in den Proteinen und Nukleinsäuren zwischen verschiedenen differenzierten Zellen wahrscheinlich keine grundlegende Antwort geben wird. Wir wissen ja schon von der klassischen Morphologie her, daß es Unterschiede gibt. Es ist statt dessen wahrscheinlich, daß einschneidende Antworten nur durch zweckentsprechendere Fragen kommen werden. Eines der wichtigsten Ziele ist die Identifizierung der äußeren Faktoren, der embryonalen Induktoren, die die gezielte Umwandlung vieler undifferenzierten Zellen verursachen. So hängt z.B. die Differenzierung vieler Nervenzellen von einem äußeren Faktor ab, den sie von benachbarten Zellen erhalten. Ein zweites wichtiges Ziel ist es herauszufinden, auf welche Weise der Induktor die undifferenzierte Zelle verändert. Besonders möchten wir gerne die Kette von Vorgängen verstehen, die zwischen den Induktoren und der Funktion bestimmter Gene liegt.

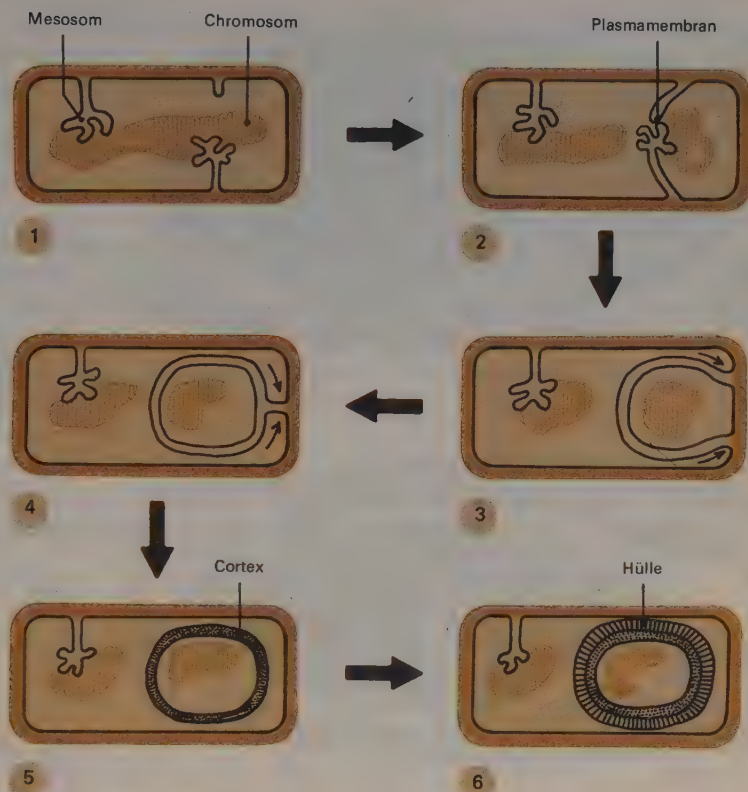
Diese Probleme werden wahrscheinlich erst dann gelöst werden, wenn undifferenzierte Zellen, die in Gewebekulturen wachsen, durch Zugabe ihrer

spezifischen embryonalen Induktoren transformiert werden können. Obwohl es in der Literatur viele Behauptungen gibt, daß solche *in vitro* Differenzierungen gelungen seien, zeigt doch eine sorgfältige Analyse der Versuche, daß sie meistens überinterpretiert wurden. So können z.B. undifferenzierte Hühnerzellen häufig durch Zugabe einer bestimmten chemischen Substanz in Nervenzellen umgewandelt werden. Auf den ersten Blick ist das ein äußerst spektakuläres Ergebnis. Leider gibt es aber nicht nur eine bestimmte Verbindung, die diese Differenzierung zu einer Nervenzelle induziert, sondern eine ziemlich große Vielzahl anscheinend nicht verwandter Moleküle führt zum gleichen Ergebnis. Bei bestimmten Konzentrationen kann sogar NaCl als Induktor fungieren. Die meisten Embryologen hegen den Verdacht, daß alle bisher bekannten chemischen Substanzen, die zur *in vitro* Induktion führen, unspezifisch wirken und daß man die wahren, spezifisch wirkenden embryonalen Induktoren noch nicht gefunden hat.

#### **SPORULATION VON BAKTERIEN IST DAS EINFACHSTE ALLER MODELLSYSTEME**

Das überwältigende Ausmaß der Aufgabe, die molekulare Basis eines komplexen Differenzierungsvorganges wie z.B. das Entstehen einer Nervenzelle zu verstehen, hat viele Leute veranlaßt, nach Zellsystemen zu suchen, die wesentlich einfacher sind als die, die die klassischen Embryologen untersuchen. Einige Biochemiker gingen so weit, ihr Interesse auf die Bildung von Bakteriosporen zu konzentrieren. Diese Sporen sind stark entwässerte Zellen, die sich innerhalb bestimmter Bakterien (z.B. des Genus *Bazillus*) als Reaktion auf suboptimale Umweltsbedingungen bilden. Da Sporen praktisch keinerlei Stoffwechselaktivität besitzen, gleichen sie den Samen höherer Pflanzen. Verglichen mit den vegetativen Bakterien sind sie äußerst resistent gegen schlechte Behandlung, wie extreme Hitze und Trockenheit. Bakterien, die Sporen produzieren können, haben daher eine weit bessere Fähigkeit, die extremen Umweltsbedingungen zu überleben, in denen viele Formen von Bakterien leben müssen.

Einige Schritte in der Entwicklung von Sporen sind in Abbildungen 16-3 und 16-4 gezeigt; man sieht, daß es in einem frühen Stadium zur Invagination eines Teiles der Bakterienmembran kommt, wodurch ein Chromosom und ein kleiner Teil des Zytoplasmas eingeschlossen werden. Danach wird eine sehr dicke und widerstandsfähige Oberflächenschicht von Proteinen an der Außenseite abgelagert. Ihre Zusammensetzung ist völlig verschieden vom Aufbau der entsprechenden Oberflächenschicht der vegetativen Form. Mit den morphologischen Umwandlungen gehen wichtige Veränderungen in der Zusammensetzung der Enzyme einher. Die verschiedenen Cytochrommole-

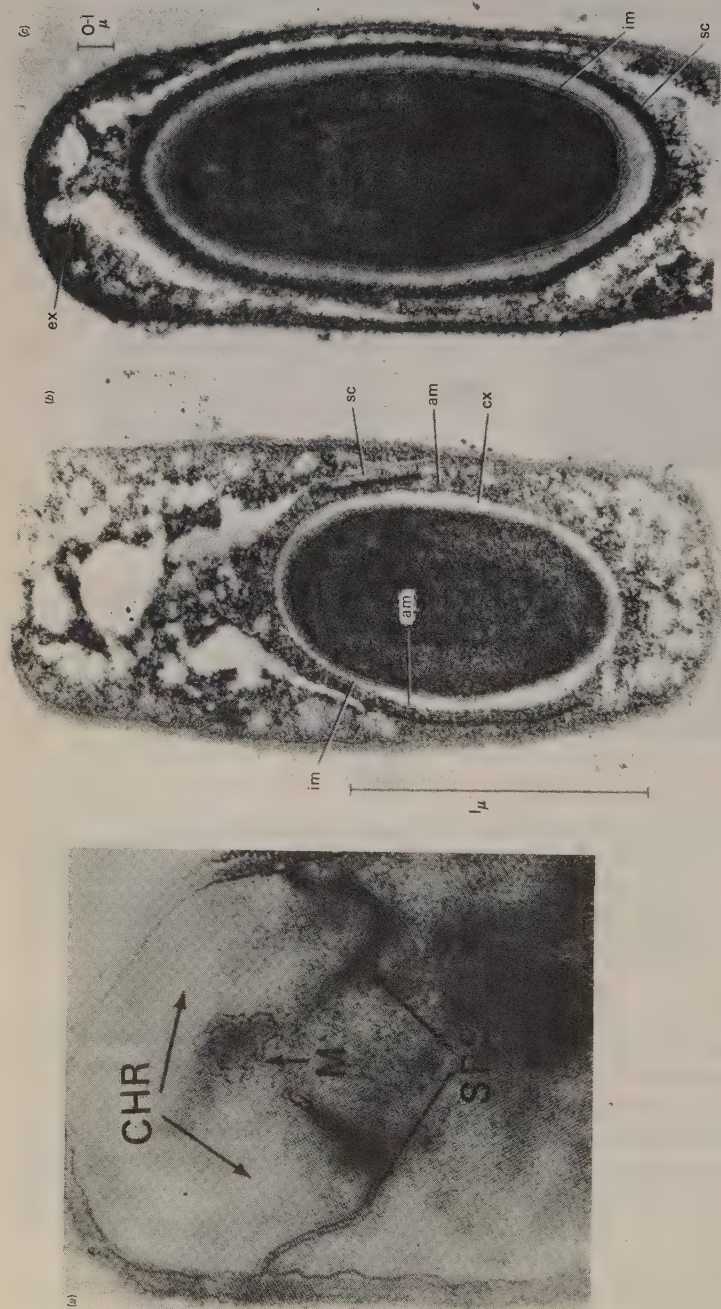


**ABBILDUNG 16-3** • Schematische Darstellung der Stadien während der Sporulation: - 1) Präseparation - Zelle mit axialem Chromosom 2) Septation - Plasmamembran stülpt sich ein und schneidet eine Region ab, die ein intaktes Chromosom enthält 3) und 4) Stadien der Protoplasteneinhüllung 5) Bildung des Cortex - Material wird zwischen zwei Membranen abgelagert 6) Bildung der Hülle und Reifung-schließlich wird die Spore freigesetzt.

küle, die für den aeroben Metabolismus verantwortlich sind, verschwinden vollständig und ein neues Elektronentransportsystem taucht auf. Der Gehalt an Ribosomen wird ebenfalls reduziert, während gleichzeitig eine noch stärkere Abnahme in der Zahl der mRNA-Moleküle stattfindet. Kleine Mengen von Enzymen, die für die Proteinsynthese notwendig sind, bleiben übrig - sie sind für die Wiederaufnahme der Proteinsynthese notwendig, wenn die Sporen unter dem Einfluß günstigerer Nährstoffbedingungen keimen.

Die Sporulation führt daher zum Abbruch der Synthese praktisch aller Proteine, die für das vegetative Dasein notwendig sind; umgekehrt ver-





**ABBILDUNG 16-4** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnitts sporulierender *Bacillus cereus* Zellen. Gezeigt sind a) die Septation, b) die Entwicklung des Cortex und c) Bildung der Hülle: CHR, Chromosom; M, Mesosom; SPS, transverses Sporenszeptum; ex, Cortex; sc, Sporenhülle (coat); im, Exosporium; im und am: innere und äußere Membranen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. W. G. Morrell).



setzt die Keimung die Sporen wieder in einen Zustand, in dem sie die vegetativen Proteine machen können. Sporenbildung muß daher die Hemmung der Synthese der meisten oder aller vegetativer mRNA-Spezies nach sich ziehen; sie wird durch die Synthese von mRNA, die spezifisch für sporenspezifische Proteine ist, ersetzt. Bis vor kurzem war die molekulare Basis diese, Umstellung völlig ungeklärt. Kürzlich durchgeführte Versuche zeigen, daß die Sporulation vom Auftreten eines neuen RNA-Polymerase- $\sigma$ -Faktors begleitet wird, welcher die Gene erkennt, die für die Sporulation notwendig sind. Gleichzeitig verschwindet eines (oder mehrere?) der vegetativen  $\sigma$ 's. Der Mechanismus, der beim sequentiellen Auftreten der Phagenproteine eine Schlüsselstellung einnimmt, ist also auch der wesentliche Faktor bei der Sporulation. Es bleiben natürlich noch sehr viele Fragen unbeantwortet (z.B. Aufklärung, auf welche Weise die Stimulierung der Sporulation - oder Keimung - eine Veränderung des  $\sigma$ -Musters bewirkt). Aber nach Jahren wirklicher Frustration kann man nun endlich annehmen, daß die Biochemie der Differenzierung einer vegetativen Zelle zur Spore einer erfolgreichen Analyse zugänglich wurde.

#### UNTERSCHIED ZWISCHEN EUKARYOTISCHEN UND PROKARYOTISCHEN ZELLEN

Bakterien sind schließlich keine höheren Zellen und man muß daher die Frage stellen: kann irgendein Mikroorganismus als gültiges Modellsystem für die Untersuchung der Differenzierung höherer Zellen dienen? Daraus erhebt sich andererseits die Frage: Gibt es irgendeinen grundlegenden Unterschied zwischen den Zellen von Bakterien und denen höherer Pflanzen und Tiere? Die Antwort ist ein eindeutiges ja. Bakterien und ihre nahen Verwandten, die blau-grünen Algen, haben keine Kerne. Man nennt sie zusammenfassend Prokaryoten. Im Gegensatz dazu werden alle Organismen mit kernhaltigen Zellen Eukaryoten genannt. Allen Prokaryoten fehlt sowohl die Kernmembran als auch Membran-begrenzte Organellen, z.B. Mitochondrien und Chloroplasten. Zusätzlich gibt es einige feinere chemische Unterschiede: z.B. findet man bestimmte Fettsäuren nur in den Membranen von Eukaryoten, während andere nur in Prokaryotenmembranen auftreten.

Die Größe der jeweiligen Ribosomen ist ebenfalls sehr charakteristisch. Prokaryoten-Ribosomen sedimentieren mit 70S, während Eukaryoten-Ribosomen stets größer sind und bei ca. 80S sedimentieren. Entsprechend ist die rRNA-Kette der größeren ribosomalen Untereinheit in Eukaryoten um ca. 50% länger als in Prokaryoten. Niemand weiß, warum es diese diversen Unterschiede gibt. Wichtig ist, daß strukturell zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen (z.B. Hefe, Neurospora, Aspergillus)

ein größerer Abstand liegt als zwischen den extremen Klassen eukaryotischer Zellen.

### ES GIBT HEUTE VIELE GRÜNDE, ORGANISMEN WIE HEFE INTENSIVER ZU UNTERSUCHEN

Die intensiven Bemühungen, die für die Untersuchung aller Aspekte von *E. coli* aufgewendet wurden, waren einer der Hauptgründe für den raschen Fortschritt der Molekularbiologie während der letzten 20 Jahre. Es ist klar, daß eine oder mehrere der eukaryotischen Zellen in Kürze eine ähnliche Aufmerksamkeit auf sich ziehen wird. Aus vielerlei Gründen ist es verständlich, daß die Untersuchung verschiedener menschlicher Zellen eine besondere Betonung verdient. Gleichzeitig könnte es trotzdem lohnend sein, sich ebenso auf die Molekularbiologie des einen oder anderen der einfachsten Eukaryoten zu konzentrieren. Dafür liegen verschiedene Gründe vor. Einer davon ist, daß diese Mikroorganismen sicher viel weniger DNA enthalten als menschliche Zellen (Abbildung 16-1). Man beobachtet nur einen fünf- bis zehnfachen Anstieg in der genetischen Komplexität, wenn man von *E. coli* zu Hefe oder *Aspergillus* geht. Ein weiterer Grund ist wirtschaftlicher Natur: Arbeit mit höheren Zellen ist um mindestens eine Größenordnung teurer als die mit Mikroorganismen. Wenn die Wahl besteht, dasselbe Problem mit menschlichen Gewebekulturzellen oder mit Hefe oder *Neurospora* zu lösen, sagt uns unser gesunder Menschenverstand daß wir uns an das einfachere System halten sollten. Der dritte und vielleicht wichtigste Grund liegt in der Leichtigkeit, mit der man detaillierte genetische Analysen auf viele Mikroorganismen anwenden kann. Trotz der großen Vorteile, die die Zellfusionstechnik mit sich gebracht hat (siehe unten), wird es äußerst schwierig sein, eine detaillierte genetische Analyse menschlicher Zellen zustande zu bringen. Auch wenn unser Hauptinteresse der menschlichen Zelle gilt, sollten sich doch zum jetzigen Zeitpunkt viel mehr Biologen mit Organismen wie Hefe beschäftigen. Man kann sie leicht als Einzelzellen züchten, sie kommen sowohl in haploidem als auch in diploidem Zustand vor und sind genetisch bereits sehr gut untersucht worden. Mutationen können genauso leicht wie in *E. coli* hervorgerufen werden, wobei die verschiedenen Gene der Hefe auf ca. 15 - 18 Chromosomen angeordnet sind. Die durchschnittliche Länge der DNA pro Hefechromosom ist wesentlich geringer als die des einzelnen *E. coli* Chromosoms. Es sollte daher bald möglich sein, Hefechromosomen zu isolieren, sie im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen und hoffentlich zu lernen, wie sie auf molekularer Ebene aussehen.

Leider gibt es noch keine guten Methoden zur Isolierung intakter Hefekerne. Die Schwierigkeit liegt hauptsächlich darin, daß man Wege finden

muß, die äußerst starke Zellwand der Hefe leicht aufzubrechen. Dieses Hindernis wird jedoch wahrscheinlich in Kürze überwunden werden und wir werden somit erfahren, wie Eukaryoten-Ribosomen zusammengebaut werden, besonders, ob mRNA als Teil eines Polyribosoms in das Zytoplasma gelangt oder ob sich die mRNA-Ketten erst nach der Penetration durch die Kernmembran an die kleinere ribosomale Untereinheit anheften.

## MITOCHONDRIEN ALS DEFEKTE PROKARYOTISCHE SYMBIONTEN

Eukaryotische Mikroorganismen stellen auch ausgezeichnete Systeme zur Untersuchung von Mitochondrien dar. Bis vor wenigen Jahren war über den Mechanismus der Mitochondrienvermehrung äußerst wenig bekannt. Dann fand man, daß alle Mitochondrien zirkuläre DNA-Moleküle enthalten, die gewöhnlich ein MG von  $\sim 8 \times 10^6$  haben; zusätzlich findet man Ribosomen, tRNA und die verschiedenen Enzyme, die für die Proteinsynthese benötigt werden. Für unsere Vorstellungen über die Biogenese von Mitochondrien war besonders wichtig, daß die mitochondrialen Ribosomen mit 70S sedimentieren, also dem Wert, der für prokaryotische Zellen charakteristisch ist. Dieser Befund legte nahe, daß sich die Mitochondrien zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution aus parasitischen Bakterien entwickelten, die die Fähigkeit besaßen, in den wesentlich größeren primitiven Eukaryoten zu wachsen. Warum und auf welche Weise diese Bakterien sich aus Parasiten zu wichtigen Zellorganellen entwickelten ist nur schwer nachzuprüfen. Eine offensichtliche Spekulation ist die, daß sie ihre Wirtszelle so gründlich mit ATP versorgten, daß ein Selektionsdruck für ihre unbedingte Anwesenheit bestand.

Man nimmt heute an, daß Chloroplasten grundlegend ähnlichen Ursprungs sind. Wie die Mitochondrien enthalten sie DNA und prokaryotische Ribosomen, was darauf hindeutet, daß sie von einer der Bakterienarten abstammen, die zur Photosynthese befähigt sind. Beide Zellorganellen wachsen der Länge nach, worauf sie sich ähnlich wie Bakterien spalten. Außerhalb einer Zelle konnte man sie jedoch weder zum Wachstum noch zur Teilung bringen. Man nimmt daher an, daß einige lebenswichtige Mitochondrien-(Chloroplasten-)Proteine durch Kern-DNA codiert werden; ihre Synthese würde danach an den zytoplasmatischen 80S - Ribosomen stattfinden, worauf sie an spezifischen Stellen in den Organellen wandern würden. Neuere Versuche bestätigen diese Annahme.

Die Erkenntnis, daß Zellorganellen ebenfalls genetisch funktionelle DNA enthalten, lieferte eine Erklärung für viele Fälle zytoplasmatischer (mütterlicher) Vererbung bei Pflanzen, die mehrere Jahrzehnte hindurch den grundlegenden Prinzipien der Mendelschen Genetik zu widersprechen schienen.

Chloroplasten kommen in großer Zahl in praktisch allen Zellen außer den männlichen Geschlechtszellen vor. Chloroplastengene werden daher nur mütterlich vererbt.

### REVERSIBLE STADIEN DER SCHLEIMPILZZELLEN

Für die Embryologen sind natürlich die Mikroorganismen, bei welchen die Zelldifferenzierung ein wichtiger Aspekt des Lebenszyklus ist, am interessantesten. Seit kurzem schenkt man daher dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* große Aufmerksamkeit. Sein Lebenszyklus ist in Abbildung 16-5 dargestellt; er beginnt mit der Keimung von Sporen zu amöboiden Zellen, den sogenannten Myxamöben. Diese unregelmäßig geformten Zellen

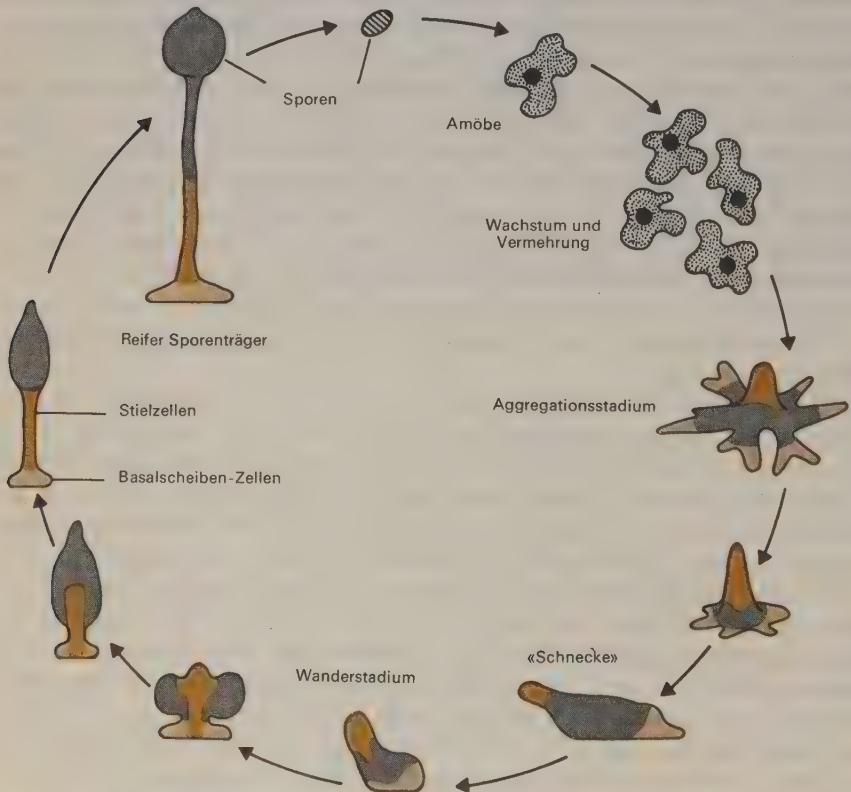


ABBILDUNG 16-5 Der Lebenszyklus des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*.

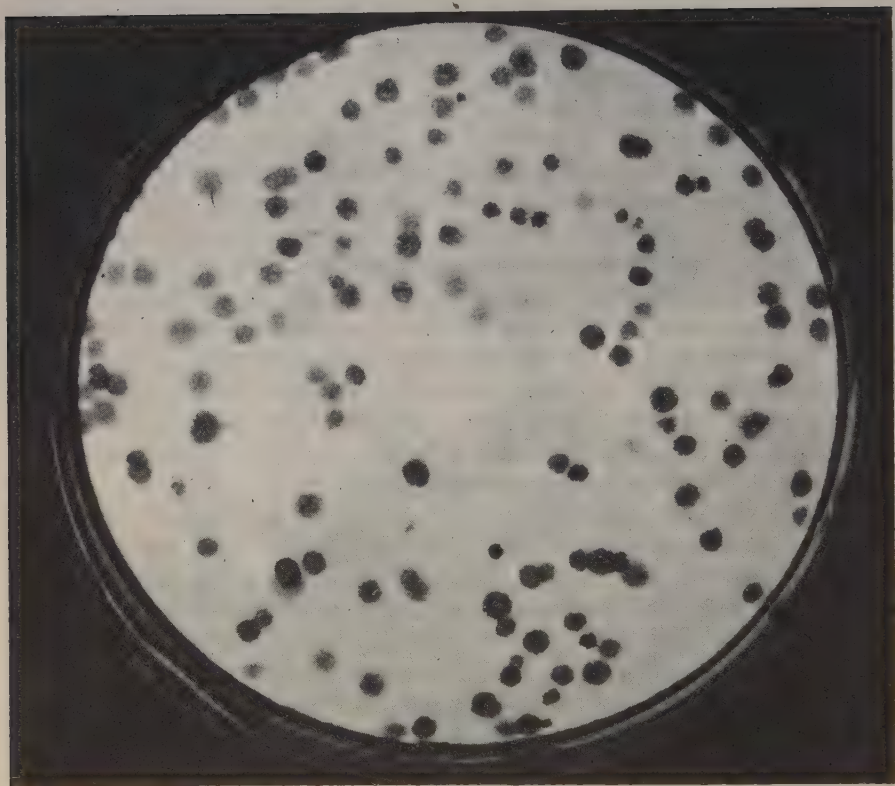


verhalten sich wie kleine Amöben, leben hauptsächlich auf Bakterien und vermehren sich durch Spaltung. Wenn ihre Nährstoffzufuhr geringer wird, häufen sie sich miteinander zu konischen Massen zusammen die schließlich seitlich umfallen. Diese «schneckenartigen» Gebilde bewegen sich dann langsam über die Oberfläche, bevor sie zur Ruhe kommen. Später bilden sie eine Sporen-produzierende Struktur, die aus einer Basalscheibe, einem Stiel und einer Menge Sporen besteht. Alle diese Komponenten entstehen durch direkte Transformation (Differenzierung) amöboider Zellen zu höher spezialisierten Zellen. Der Zelltyp, in den sie sich umwandeln, hängt davon ab, in welcher Reihenfolge sie ein Teil des ursprünglichen Aggregats wurden. Die ersten sich anhäufenden Zellen bilden den unteren Stiel, die nächste Gruppe wandelt sich in den oberen Stiel und in Sporenzellen um, während die Basalscheibe aus den zuletzt angehäuften Zellen entsteht. Mit der Zeit sterben alle Zellen der Basalscheibe und des Stiels ab und hinterlassen die Sporen, die dazu fähig sind, unter günstigen Nährstoffbedingungen wieder einen neuen Lebenszyklus zu beginnen.

Abgesehen vom letzten Schritt der Sporenbildung sind alle obgenannten Beispiele für Differenzierung total reversibel. Wenn man z.B. Stielzellen aus dem Sporenträger vor dem Zellverfall isoliert, können sie sich in die amöboide Phase zurückverwandeln und sich anschließend durch Spaltung teilen. Man hat keine Ahnung von der molekularen Grundlage dieser verschiedenen Differenzierungsvorgänge. Höchstwahrscheinlich wird man in Kürze Untersuchungen über die  $\sigma$ -Faktoren der RNA-Polymerase aus Stiel, Scheiben und Sporenzellen in Angriff nehmen, um zu sehen, ob sie sich von denen der amöboiden Vorläuferzellen unterscheiden.

## WACHSTUM HÖHERER TIERISCHER ZELLEN IN GEWEBEKULTUR

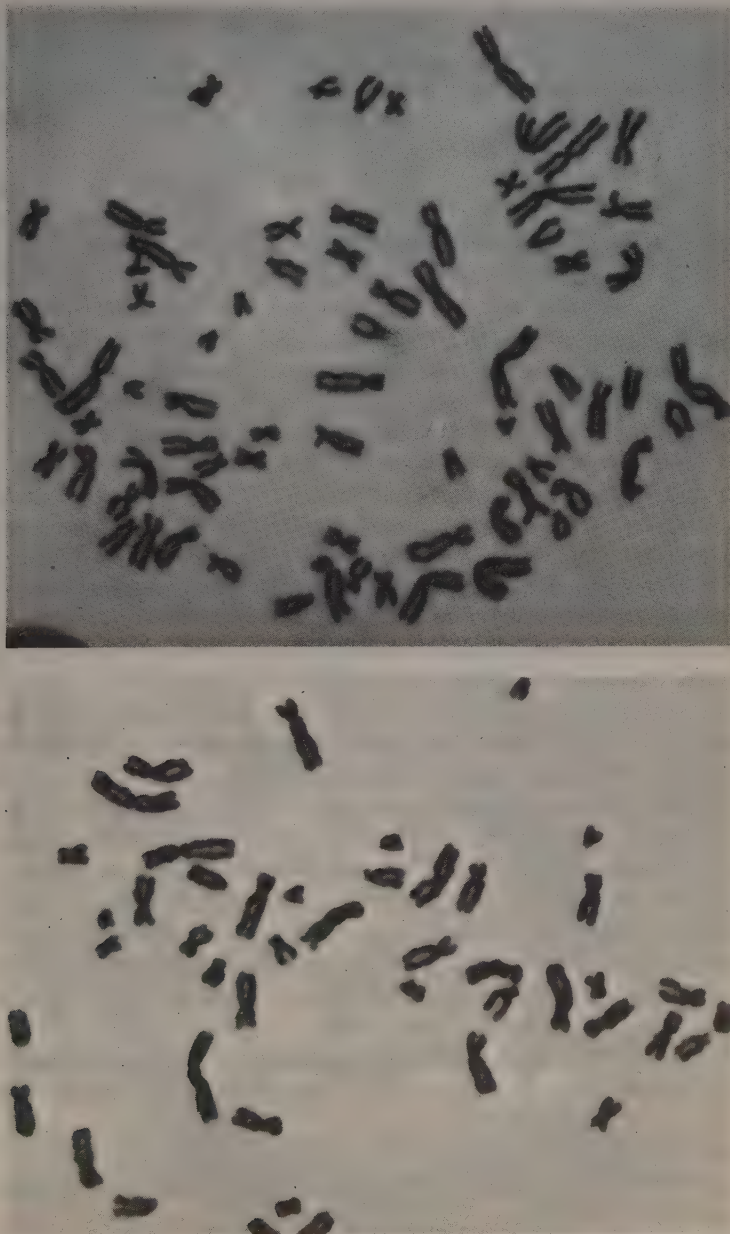
Bis vor kurzem war das Züchten von Zellen in Gewebekultur etwas äußerst Geheimnisvolles. Der Erfolg hing offensichtlich von ganz genauen Versuchsbedingungen ab und, noch schlimmer, nicht jeder schien die notwendigen magischen Fähigkeiten zu besitzen. Es konnten nur spezielle Zelllinien gehalten werden und es bestand der Verdacht, daß diese Zellen die meisten charakteristischen Eigenschaften der verschiedenen Gewebe, aus denen sie ursprünglich isoliert worden waren, verloren hatten. Während der letzten Jahre hat sich das Bild jedoch radikal geändert. Es wird immer leichter, eine große Vielfalt von Zellen in wohl-definierten Medien zu züchten, in welchen die einzige undefinierte Komponente ein Serumproteinbestandteil ist. Zellen wachsen im allgemeinen sowohl in flüssigen Kulturen als auch auf Oberflächen fester Medien; die Einzelzell-Klonierungen, die bei Bakte-



**ABBILDUNG 16-6** *Klone der menschlichen Gewebekultur-Zelllinie HeLa, die auf der Agar-beschichteten Oberfläche einer Petrischale wachsen. (Das Photo wurde von Dr. T. T. Puck, Univ. of Colorado Medical School zur Verfügung gestellt).*

rien angewendet wurden, sind nun auch in der modernen Gewebekultur zur Routine geworden (Abbildung 16-6).

Es ist jedoch sicher, daß Zellen etablierter Zelllinien in den meisten Fällen echte, und vielleicht wichtige Unterschiede zu ihren zellulären Vorläufern *in vivo* aufweisen. Ein sehr häufiger Ausdruck der Anpassung an die Gewebekultur ist eine Zunahme der Chromosomenzahl; oft findet man eine Zahl, die fast doppelt so groß wie die normale ist. So enthalten z.B. die Zellen einer der bekanntesten menschlichen Zelllinien, der HeLa-Linie, üblicherweise 70 - 80 Chromosomen im Vergleich zu den 46, die man normalerweise findet (Abbildung 16-7). Anscheinend verleiht der Besitz zusätzlicher Chromosomen (*Aneuploidie*) den Gewebekulturzellen irgendeinen selektiven Vorteil über die Zellen, die die normale diploide Zahl enthalten. Die meisten



**ABBILDUNG 16-7** Die 73 Chromosomen (oben) der HeLa-Zelle im Vergleich zu der normalen Anzahl von 46 (unten) einer Zelle eines normalen Mannes (Mit freundlicher Erlaubnis von Dr. T. T. Puck, Univ. of Colorado, Denver).

Zellen enthalten zu dem Zeitpunkt, zu dem sie in eine Gewebekultur gebracht werden, die diploide Chromosomenzahl. Während der ersten Phase des langsamen Wachstums entstehen zeitweilig mutierte Zellen mit zusätzlichen Chromosomen. Diese wachsen schneller als ihre diploiden Genossen und dominieren schließlich die entstehende Zelllinie.

## KLONIERUNG HOCHDIFFERENZIIERTER ZELLEN

Gleichzeitig mit der Tendenz zur Aneuploidie scheinen manche Gewebekultur-Zelllinien bedeutend weniger differenziert zu sein als ihre *in vivo* Vorläufer. Spezifische Funktionen der Elternzellen fehlen ihnen; häufig zeigen sie einige Ähnlichkeit mit den undifferenzierten Embryonalzellen, die sehr früh in der Entwicklung vorliegen. Man hat sie auch mit Krebszellen verglichen, von denen einige ebenfalls entdifferenzierte Zellen zu sein scheinen. Die letztere Parallele scheint umso plausibler, wenn man sich vor Augen hält, daß ein kontinuierliches Zellwachstum in Gewebekultur häufig dadurch erreicht werden muß, daß Mechanismen ausfallen, die die Teilung der meisten Zellen eines multizellulären Organismus verlangsamen oder hemmen. Die Isolierung einiger Gewebekultur-Zelllinien könnte daher davon abhängen, daß Mutanten selektiert werden, die weniger gut auf Signale ansprechen, die ihnen befehlen, mit der Teilung aufzuhören.

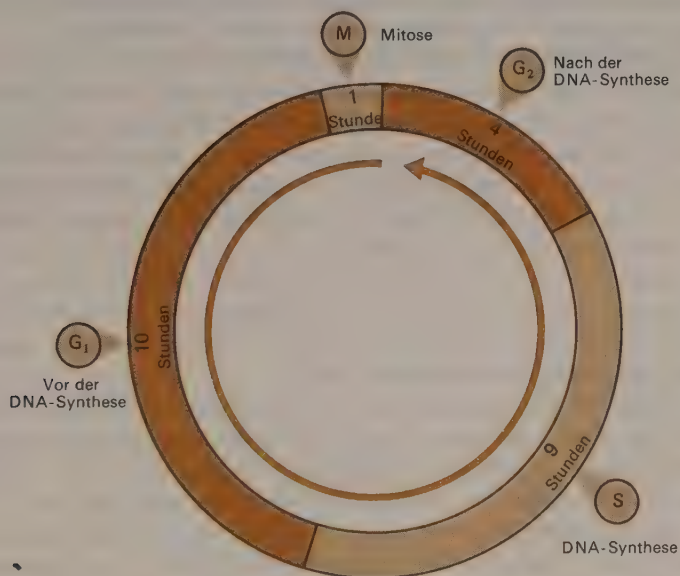
Es gibt heute aber auch viele Zelllinien, die ihre Fähigkeit, spezialisierte Produkte zu machen, beibehalten; z.B. kann man sehr leicht Zellen isolieren die fortfahren, Kollagen zu synthetisieren. Ebenso leicht ist es, Zellen zu halten, die die hauptsächlichen Mukoproteine des Knorpelgewebes synthetisieren. Endokrine Tumoren (z.B. der Nebennierenrinde und der Hypophyse) dienen als Quelle vieler Zelllinien, die ihre entsprechenden Hormone weiter synthetisieren. Es gibt außerdem Berichte über die Synthese von Schilddrüsenhormon und von Insulin in Zelllinien, die von normalem Gewebe abstammen. Große Fortschritte wurden auch bei der Kultivierung verschiedener Vorläuferzellen weißer und roter Blutzellen gemacht. Es wurden nicht nur viele lymphoide Zellen kloniert, sondern es gibt jetzt auch überzeugende Berichte über die Synthese spezifischer Antikörper und, noch entscheidender, über die Induktion einer Immunreaktion (siehe Kapitel 17) in Gewebekultur.

## UNTERTEILUNG DES ZELLZYKLUS IN M, G<sub>1</sub>, S UND G<sub>2</sub> -PHASEN

Eins der wichtigsten Instrumente für die Analyse des Zellzyklus ist die Wachstumssynchronisierung, sodaß sich praktisch alle Zellen in derselben Wachstumsphase befinden. Allgemein teilt man jetzt den Zyklus in folgende



Phasen ein: M (Mitose),  $G_1$  (Periode bevor DNA-Synthese beginnt), S (Periode der DNA-Synthese) und  $G_2$  (Periode zwischen DNA-Synthese und Mitose) (Abbildung 16-8). M ist die kürzeste Phase. Sie dauert im allgemeinen nur etwa eine Stunde bei einer Gesamtzyklusdauer von 18-24 Stunden, der kürzesten Zeit, die man im allgemeinen in Kultur bei Säugetierzellen beobachtet. Die Dauer der anderen Phasen kann von Zelltyp zu Zelltyp stark variieren, wobei  $G_1$  und S häufig 8-10 Stunden beanspruchen. Bei anderen Zelllinien dauert  $G_1$  jedoch nur 1-2 Stunden. Eine der besten Methoden zur Synchronisation bedient sich der Tatsache, daß Zellen in der M-Phase meist viel weniger fest an Glasoberflächen haften als Interphase-Zellen. Mit Hilfe dieses Tricks kann man größere Mengen von Zellen in den verschiedenen Wachstumsphasen isolieren und die Syntheserate der verschiedenen wichtigen Verbindungen messen. In HeLa-Zellen findet die Synthese von RNA und Protein während der gesamten Interphase ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) statt; beide zeigen jedoch während der Mitose, wenn sich die Chromosomen verdichten und entlang der Spindelfasern anordnen, einen deutlichen Abfall oder hören sogar ganz auf. Das Aufhören der RNA-Synthese könnte man sich aufgrund von Konformationsänderungen in der DNA erklären, die mit der Kontraktion der Metaphasechromosomen einhergehen. Warum



**ABBILDUNG 16-8** Die verschiedenen Phasen im Lebenszyklus einer Maus-Hepatomzelle, die in Gewebekultur wächst und sich alle 24 Stunden einmal teilt.

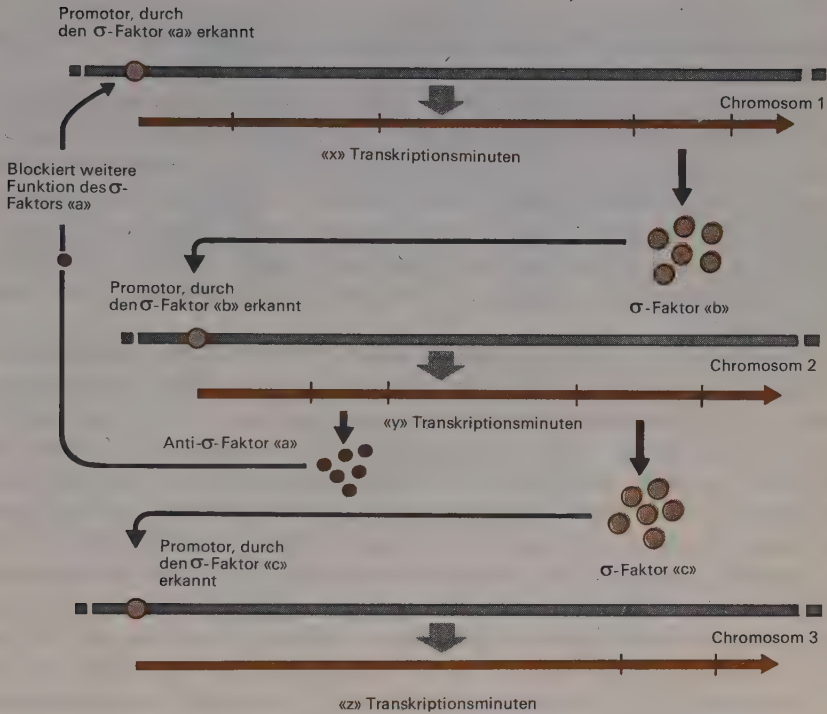
die Proteinsynthese zum Stillstand kommt, weiß man nicht, aber es könnte sein, daß das Angebot von mRNA rasch abnimmt, wenn die RNA-Synthese aufhört. Falls das so ist, müßte die Lebensdauer der mRNA in höheren Tieren kürzer sein als 3 bis 4 Stunden wie üblicherweise angenommen wird. Auf jeden Fall findet man in elektronenmikroskopischen Aufnahmen tierischer Zellen während der Metaphase praktisch keine Polyribosomen.

## DIE TRANSKRIPTION ALS BIOLOGISCHER ZEITMESSER

Die Tatsache, daß sich Gewebekulturzellen bevorzugt in konstanten Zeitabständen teilen, läßt vermuten, daß Eukaryoten, wie Prokaryoten, auf zellulärer Ebene ein genaues Uhrwerk besitzen. Wir haben schon früher gesehen, daß Bakterienviren den Abstand zwischen Genen als Zeitmesser benutzen können, da die RNA-Polymerasemoleküle relativ langsam über die DNA-Matrize wandern (die DNA-Replikation läuft ca. 100 mal schneller ab!). Bei 37°C beträgt die Bewegungsgeschwindigkeit der *E. coli* RNA-Polymerase nur etwa 30 - 40 Nukleotide pro Sekunde; die vollständige Transkription eines  $\lambda$ -Moleküls würde daher mehr als 25 Minuten in Anspruch nehmen. Da jedoch gleichzeitig mehrere Operons transkribiert werden, braucht ein einziger Replikationszyklus nicht so lange. Trotzdem dauert die Transkription des sehr langen «späten»  $\lambda$ -Operons allein schon ca. 15 Minuten.

Wenn man die gleiche Art der Analyse auf das *E. coli* Chromosom anwendet, kommt man zu einer möglichen Gesamtzeit von 33 Stunden für die Transkription. 1% des gesamten Genoms würde also bereits genügen, um periodische Vorgänge, die einmal im 20-minutigen Lebenszyklus ablaufen, zu separieren. Sogar die 3 - 4 Stunden, die eine Spore zum Keimen braucht, könnten leicht unmittelbar auf einem DNA-Maßband abgemessen werden. Es besteht allerdings kein Grund warum solch relativ lange Intervalle auf einem zusammenhängenden DNA Abschnitt codiert werden müssen. Verschiedene Operons, die jeweils für einen spezifischen, für die Ablesung des nächsten transkribierten Operons notwendigen  $\sigma$ -Faktor codieren, würden den gleichen Zweck erfüllen (Abbildung 16-9).

Wahrscheinlich hängen alle biologischen Uhren dieser Art auch noch vom regelmäßigen Auftreten von Anti- $\sigma$ -Faktoren ab, das heißt von Genprodukten, die spezifisch bestimmte  $\sigma$ -Faktoren funktionsunfähig machen. Solche Faktoren stellen den direktesten Weg dar, die Synthese spezifischer Proteine auf eine kurze Periode im Lebenszyklus zu beschränken. Daß solche Faktoren tatsächlich existieren, weiß man vom Vermehrungszyklus des T4 Phagen (siehe Seite 453), bei dem mindestens ein Virusgen ein Produkt codiert, das die Funktion des *E. coli*- $\sigma$ -Faktors hemmt. Da der Wachstumszyklus von Bakterien wesentlich komplizierter ist als der von Phagen, müssen



**ABBILDUNG 16-9** Ein Mechanismus, durch den die schrittweise Synthese verschiedener  $\sigma$ -Faktoren als Zeitmesser benutzt werden könnte.

mehrere verschiedene Anti- $\sigma$ -Faktoren beteiligt sein, die alle zu verschiedenen Zeiten eingreifen, um die Funktion bestimmter Gene zu blockieren.

Die Generationszeiten höherer Zellen sind zwar wesentlich länger, dafür ist aber auch der DNA Gehalt entsprechend größer; ein einziges Polymerasemolekül würde bei 37° C ca. 1000 Tage brauchen, um die haploide Zahl menschlicher Gene vollständig zu transkribieren. Man kann sich daher leicht vorstellen, daß ein großer Teil der Zeiteinteilung, die für den 24-stündigen Zellzyklus einer menschlichen Zelle erforderlich ist, auf der Transkriptionsebene vorgenommen wird; das gleiche gilt vielleicht für die zeitliche Einteilung vieler entscheidender Schritte in der Embryonalentwicklung aller höherer Organismen.

## DAS EUKARYOTENCHROMOSOM

Über die Struktur der Chromosomen höherer Pflanzen und Tiere ist äußerst wenig bekannt.

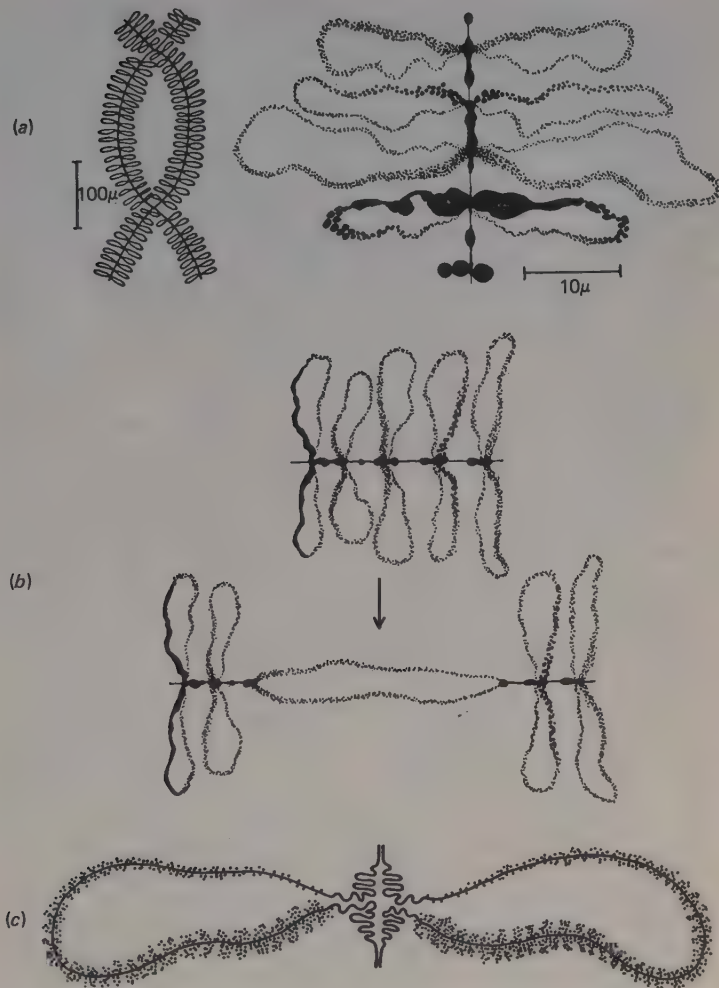
Die Beziehung zwischen einzelnen DNA-Molekülen und dem Chromosom, wie man es im Mikroskop sieht, ist noch immer verwirrend. Bei Viren und Bakterien ist die Antwort eindeutig: Das Chromosom besteht aus einem reinen DNA-Molekül, das meistens in zirkulärer Form vorliegt. Dagegen weiß niemand, wieviele DNA-Moleküle in einem einzelnen Eukaryotenchromosom vorhanden sind, noch welche Beziehung sie auf molekularer Ebene zum Zentromeren haben, das selbst auf molekularer Ebene ein komplettes Rätsel ist.

Diese Unkenntnis ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Chromosomen der meisten Zellen eine äußerst unregelmäßige Konfiguration haben. Im Lichtmikroskop sieht man sie im allgemeinen nur im kontrahierten Zustand während der Mitose und Meiose. Die kompakten Strukturen, die sich dabei ergeben, sind jedoch im Elektronenmikroskop praktisch nicht aufzulösen. In der äußerst gestreckten Form, die sie während der Interphase annehmen, ist die Konfiguration andererseits häufig so unregelmäßig, daß es gewöhnlich unmöglich ist, sie auch nur über kurze Abschnitte der Gesamtlänge hinweg zu verfolgen. Obwohl elektronenmikroskopische Aufnahmen häufig lange, dünne Fäden zeigen, haben diese oft Durchmesser, die um ein mehrfaches größer sind ( $50 - 75 \text{ \AA}$ ) als die einzelner DNA Fasern.

Von den zur Zeit verfügbaren Chromosomen werden für Strukturanalysen gerne die von Wirbeltieroozyten verwendet, kurz vor der ersten meiotischen Teilung. In diesem Stadium, das mehrere hundert Tage dauern kann, synthetisieren die Oozyten einen Großteil der mRNA, die nach der Befruchtung während der frühen Entwicklungsstadien verwendet wird. Um diese Synthese zu ermöglichen, sind die Oozytenchromosomen nur teilweise kontrahiert und zwar so, daß ein Teil der DNA dicht zusammengepackt ist (Chromomeres), während kleine Abschnitte sich in einem langgestreckten funktionsfähigen Zustand befinden. Diese funktionsfähige DNA ragt seitlich in sehr langen Schlingen aus der Hauptachse des Chromosoms heraus (Abbildungen 16-10 und 16-11), weshalb man von «Lampenbürsten»-Chromosomen spricht.

Man nimmt heute als am ehesten wahrscheinlich an, daß es an jedem Punkt eines bestimmten Chromosoms nur ein DNA-Molekül gibt. Diese Annahme trifft bestimmt auf die Schlingenregion zu, wo man im Elektronenmikroskop einzelne DNA-Moleküle direkt beobachten kann. Die Theorie, daß ein einziges DNA-Molekül durch das dazwischenliegende axiale Chromomere(en) von Schlinge zu Schlinge läuft, ist noch unbewiesen. Man hofft, daß weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen diese Frage klären werden. Ein eindeutiger Unterschied zwischen prokaryotischen und eukaryo-





**ABBILDUNG 16-10** Schematische Darstellung von Lampenbürsten-Chromosomen. a) Die beiden homologen meiotischen Chromosomen (links) sind durch zwei Chiasmata verbunden. Ein Teil der zentralen Chromosomenachse (rechts) zeigt, daß zwei Schlingen identischer Morphologie von einem bestimmten Punkt ausgehen, was beweist, daß jedes Chromosom sich bereits in zwei Chromatide gespalten hat. b) Die zufällige Streckung eines Chromosoms zeigt, daß die Achse der Schleife die Fortsetzung der Zentralachse ist (vergleiche Abbildung 16-11). c) Ein einziges Schlingenpaar, das die einzelnen DNA-Moleküle zeigt, an denen die RNA-Ketten synthetisiert werden. [Aus J. Gall, Brookhaven Symp. in Biol., 8, 17 (1955)].



**ABBILDUNG 16-11** Teilansicht eines Paares langgestreckter Lampenbürsten-Chromosomen aus einem Oozyten des Molches *Triturus viridescens*. Auf dem Bild sieht man zwei Chiasmata während der diplotänen Phase der Meiose. Die Pfeile zeigen einen Bereich an, in dem der Doppelstrangcharakter jedes der beiden prämeiotischen Chromosome zu sehen ist. (Mit freundlicher Genehmigung von J. Gall, Yale University).

tischen Chromosomen ist das anscheinend völlige Fehlen von Histonen (kleine, basische Proteine) beim Prokaryotenchromosom. Dagegen besteht ein Eukaryotenchromosom im allgemeinen mindestens zur Hälfte aus Histon. Ursprünglich hegte man den Verdacht, daß es viele verschiedene Histone gäbe, möglicherweise eine bestimmte Art für jedes der verschiedenen Gene. Es wurde deshalb vorgeschlagen, daß Histone mit den spezifischen Repressoren bei Bakterien vergleichbar wären. Man weiß jetzt aber, daß es in einem bestimmten Organismus nur wenige verschiedene Arten von Histonen gibt. Außerdem ist die Aminosäuresequenz eines bestimmten Säugetier-Histons identisch mit einem Histon, das man in höheren Pflanzen findet. Es besteht daher keine Möglichkeit, daß Histone sich spezifisch mit sogar großen Gruppen verwandter Gene verbinden.

#### **DNA-REPLIKATION BEGINNT AN MEHREREN VERSCHIEDENEN STELLEN AUF EINEM BESTIMMTEN CHROMOSOM**

Es gibt bereits verschiedene Hinweise dafür, daß die DNA-Replikation an mehreren verschiedenen Stellen auf einem bestimmten Chromosom beginnt. Manches deutet darauf hin, daß auf einem gegebenen Säugetierchromosom durchschnittlich alle 100 $\mu$  ein Anfangspunkt liegt. Interessanterweise zeigen direkte autoradiographische Daten an, daß das Wachstum vom Initiationspunkt ausgehend in beiden Richtungen abläuft (Abbildung 16-12). Das bedeutet, daß der grundlegende Replikationsmechanismus bei Eukaryoten dem von *E. coli* und sein Viren sehr ähnlich ist. Auch dort läuft die Synthese in beiden Richtungen ab. Für das weitere Verständnis ist es entscheidend, ob es auch auf einem einzigen DNA-Molekül mehr als einen Anfangspunkt gibt.

#### **AKTIVE (EUCHROMATIN) GEGENÜBER INAKTIVEN (HETEROCHROMATIN) REGIONEN AUF CHROMOSOMEN**

Einer der besten Beweise für die selektive Funktionsbereitschaft verschiedener Regionen eines Chromosoms stammt von Untersuchungen der Riesenchromosomen der Fliegen *Drosophila* und *Chironomus*. Diese Chromosomen können sogar während der Interphase leicht beobachtet werden, da sie eine Ansammlung von 1000 identischen Chromosomen darstellen, die ganz ordentlich seitlich nebeneinander liegen (ein polytänes Chromosom). Dort, wo die Gene unter Bildung wohl-definierter Banden eng aneinander liegen, sind sie nicht funktionsbereit; autoradiographische Untersuchungen mit radioaktiven RNA-Vorstufen deuten nämlich darauf hin, daß in diesen regel-

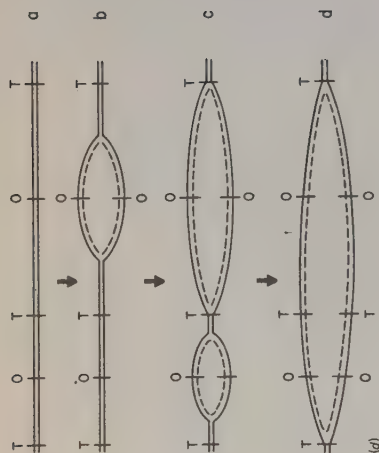
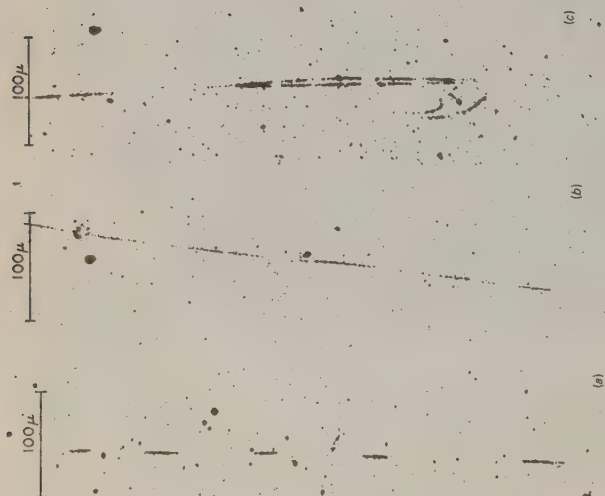


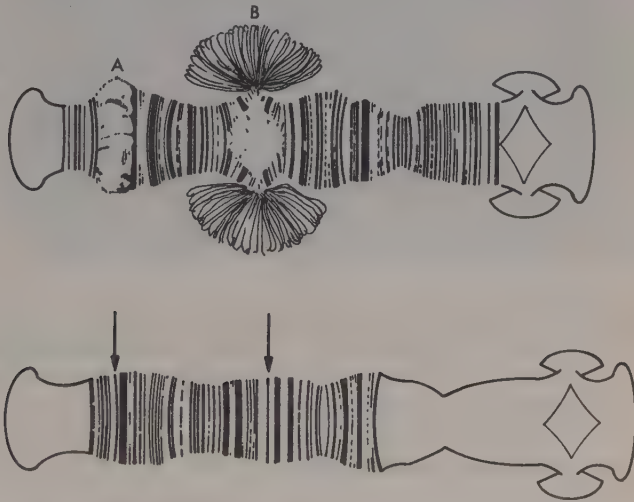
ABBILDUNG 16-12

Wachstum eines Säugetierchromosoms in beiden Richtungen. a) Autoradiographie eines DNA-Moleküls des chinesischen Hamsters; die Zelle wurde kurz mit tritiertem Thymidin markiert. Die hintereinander angeordneten Bereiche von Silberkörnern zeigen, daß auf dem vorliegenden Abschnitt der DNA-Faser verschiedene Replikationspunkte vorhanden sind. b) Hintereinander angeordnete Bereiche nach Pulsmarkierung, gefolgt von einer «chases»-Periode in kaltem Medium. Die Dichte der Silberkörner nimmt hier von der Mitte zum Ende hin ab, woraus man schließen kann, daß die Wachstumspunkte in entgegengesetzte Richtungen wandern. c) Beispiel für zwei replizierende Schwestermoleküle, die durch die Replikationsgabel zusammengehalten werden. d) Schematische Modelldarstellung zur Interpretation der Bilder a) bis c). [Die Bilder in a, b, und c wurden freundlicherweise von J. Hubermann zur Verfügung gestellt; sie erschienen ursprünglich in Hubermann und Riggs, J. Mol. Bio. 32, 327 (1968).]



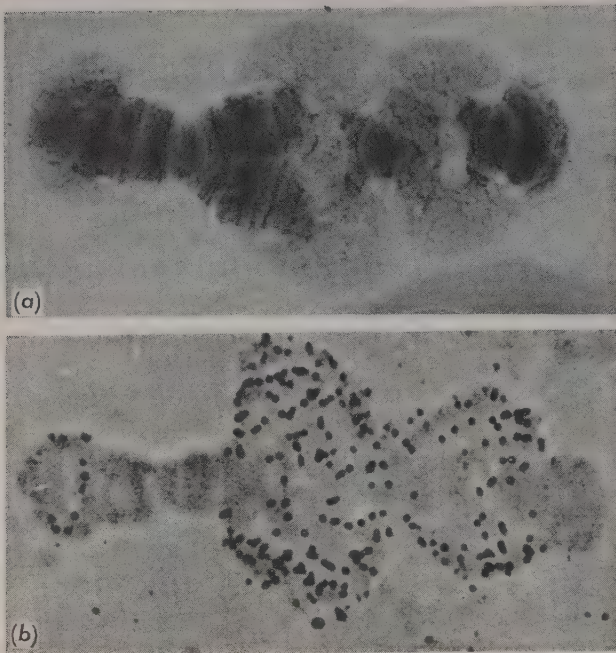


mäßig angeordneten Regionen nur sehr wenig RNA synthetisiert wird. Die Stärke der Banden variiert unheimlich: einige sind so dünn, daß man sie kaum sieht, während andere einige Prozent der Gesamtlänge eines bestimmten Chromosoms einnehmen. Es gibt jedoch andere Bereiche auf diesen Chromosomen, an denen die einzelnen Chromosomen eine wesentlich unorganisiertere Anordnung zeigen (Abbildung 16-13). Die auffälligsten Bereiche dieser Art bezeichnet man als «Puffs»; hier wird intensiv RNA synthetisiert (Abbildung 16-14), es sind also äußerst aktive Gene. Bemerkenswert ist, daß die Stellen, an denen man die Puffs findet, während der Embryonalentwicklung nicht konstant bleiben. Es scheint statt dessen, daß einige Gene nur zu bestimmten Stadien der Entwicklung aktiv-sind.



**ABBILDUNG 16-13** Schematische Darstellung eines Teils des riesigen Insektenchromosoms aus der Speicheldrüse von *Chironomus*, in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien. Die beiden Puffs A und B, die im ersten Stadium beobachtet werden, sind später nicht mehr zu sehen. Der Ursprung der Puffs A und B kann auf einzelne Banden des ungestreckten Zustandes zurückverfolgt werden [Zeichnung nach W. Beermann, *Chromosoma*, 5 (2), Tabelle 1 (1952), mit freundlicher Genehmigung].

Der Ausdruck *Euchromatin* wird häufig zur Beschreibung funktionsbereiter, diffuser Bereiche verwendet, während die großen Bezirke kompakter DNA, die manchmal sogar während der Interphase zu sehen sind, als *Heterochromatin* bezeichnet werden. Es gibt viele Gelegenheiten bei denen ein Gen durch eine neue Chromosomenanordnung, durch die es in eine Hetero-



**ABBILDUNG 16-14** *Autoradiographie eines Riesenchromosoms eines Insekts, das mit radioaktivem Uridin injiziert wurde (mit freundlicher Genehmigung von W. Beer-mann). Ein Großteil der RNA-Synthese findet an den Puffs statt, wie durch den Einbau radioaktiven Uridins gezeigt wird. a) Chromosom 4 der Speicheldrüse von *Chironomus tentans* mit drei großen Puffs. b) Autoradiographie desselben Chromosoms mit denselben drei Puffs nach halbstündigem Puls mit tritiiertem Uridin.*

chromatinregion fällt, seine Aktivität verliert. Man kann daraus schließen, daß es Kontrollmechanismen gibt, durch die sehr lange Abschnitte auf einem bestimmten Chromosom aktiviert oder inaktiviert werden können. Das wurde zuerst für *Drosophila* gezeigt, trifft aber genauso für Säugetiersysteme zu. Die überraschendsten Ergebnisse betreffen die Geschlechtschromosomen. Vor kurzem wurde die unerwartete Entdeckung gemacht, daß in weiblichen Säugetieren die beiden homologen X-Chromosomen ganz verschieden aussehen. Eines erscheint immer dicht gepackt, was darauf hindeutet, daß es nicht aktiv ist; das andere ist langgestreckt. Diese Hinweise wurden durch biochemische Analysen unterstützt, die ebenfalls zeigen, daß nur ein Gen des X-Chromosomenpaares in einer bestimmten Zelle aktiv ist. Überraschenderweise wechselt das inaktive Chromosom von Zelle zu Zelle; weibliches Gewebe besteht

daher in Wirklichkeit aus einem Mosaik zweier verschiedener Zelltypen. Obwohl die molekulare Grundlage dieses seltsamen Phänomens, das auf das X-Chromosom beschränkt zu sein scheint, noch unbekannt ist, ist es ausgesprochen wichtig, da es zeigt, daß es Mechanismen gibt, die spezifisch die Funktionsfähigkeit eines ganzen Chromosoms verhindern können.

Andere Säugetierchromosomen zeigen zwar keinen Alles- oder Nichts-Effekt, sie können aber auch längere Heterochromatinbereiche enthalten; ihr Ausmaß hängt wieder davon ab, zu welchem Zeitpunkt während des Wachstumszyklus man sie beobachtet. Am wichtigsten ist, daß viele Bereiche, die später im Leben heterochromatisch werden, in der frühen Entwicklung als Euchromatin erscheinen. Es ist daher wahrscheinlich, daß sie Gene tragen, die zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung aktiv sein müssen.

Es schien anfänglich wahrscheinlich, daß die inaktiven Heterochromatinbereiche mehr Histon enthielten, wodurch sie für die Bindung der RNA-Polymerase wenig zugänglich wären. Die wenigen Daten, die bis jetzt vorliegen, zeigen jedoch, daß fast die gleiche Menge von Histon sowohl an Heterochromatin als auch an Euchromatin gebunden ist, wodurch die Frage nach der wirklichen Funktion von Histonen in höheren Zellen weiterhin offen bleibt.

#### **SOGAR DIE KLEINSTEN BANDEN (SCHLINGEN) MÜSSEN SEHR, SEHR VIELE GENE ENTHALTEN**

Als man die Banden in den Speicheldrüsenchromosomen in den frühen dreißiger Jahren zum ersten Mal beobachtete, hielt man sie für einzelne Gene und man glaubte, daß die Zahl der Gene der Zahl der Banden entspräche. Diese Art der Analyse würde jedoch *Drosophila* nur ca. 5000 Gene zugestehen, eine Zahl, die nur um wenig größer als die für *E. coli* postulierte ist. Die Zahl ist sicher zu niedrig, da wir heute wissen, daß die Regionen zwischen den Banden wahrscheinlich sehr viele Gene enthalten.

Noch wichtiger ist die Tatsache, daß neuere Messungen der DNA-Menge sogar innerhalb der kleinsten Bande zeigen, daß jede einzelne der Chromosomenfasern, die das polytäre Chromosom ausmachen, genügend DNA für mehrere hundert Gene normaler Größe enthält. Das könnte bedeuten, daß jede Bande ein Operon darstellt, das aus einer großen Zahl von Genen besteht, die verwandte Funktionen ausüben und deren Genprodukte koordiniert auftreten. Andererseits könnten die Banden viele identische Kopien eines einzelnen Gens oder von Genansammlungen (Operons) enthalten, die hintereinander fortlaufend angeordnet sind. Diese zweite Möglichkeit wird durch die Tatsache unterstützt, daß der DNA Gehalt homologer Banden bei nahe



verwandten Spezies sehr unterschiedlich sein kann, was vermuten läßt, daß die größeren Banden durch Duplikation ursprünglich kleinerer Banden entstehen.

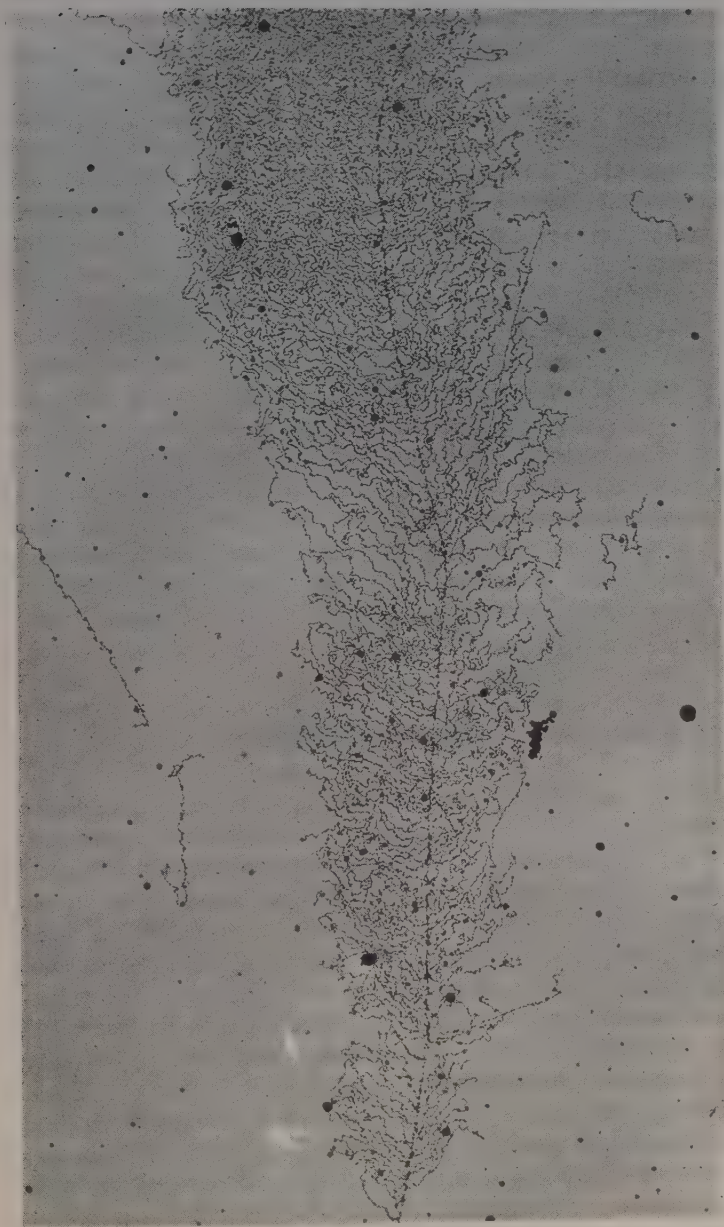
Die gleiche Ungewißheit herrscht auch bezüglich der DNA, die die Schlingen der Lampenbürsten-Chromosomen ausmacht. Minimale Schätzungen für die Länge der DNA in den Schlingen geben Werte ( $10\mu$  -  $100\mu$ ), die wesentlich größer sind als für die Codierung eines einzelnen durchschnittlich großen Proteins nötig wäre ( $< 1\mu$ ). Es gibt zur Zeit keine Möglichkeit, festzustellen, ob jede Schlinge aus einem langen Operon oder aus vielen identischen Kopien des gleichen Gens besteht. Alles, was wir wissen, ist, daß die einzelnen RNA Produkte sehr, sehr lang sind und das Transkriptionsprodukt der gesamten Schlinge darstellen (Abbildung 16-15). Ein Ende der Schlinge sieht daher immer viel dicker aus als das andere, wobei das dickere Ende die sehr langen, fast vollendeten RNA Produkte enthält.

Es ist theoretisch möglich, das Ausmaß der Redundanz von Genen, deren entsprechende mRNA-Moleküle isoliert werden können, direkt zu messen. Wahrscheinlich werden reine Hämoglobin- und reine Immunglobulin-(Antikörper-)-mRNAs bald zur Verfügung stehen. Sie sind in ihren entsprechenden Zellen die prädominierenden mRNA-Spezies. Man kann dann unmittelbar die Zahl der Hämoglobin-(Immunglobulin-) Gene titrieren, die zur Bildung spezifischer DNA-RNA-Hybriden fähig sind. Solche Hybridisierungsversuche sollten natürlich sowohl mit DNA aus Zellen, die aktiv Hämoglobin (Immunglobulin) synthetisieren, als auch mit DNA aus Zellen, die normalerweise kein Hämoglobin (Immunglobulin) machen, durchgeführt werden. Die Ergebnisse, die man unter Verwendung von DNA erhält, die aus nicht-Hämoglobin (Immunglobulin)-produzierenden Zellen stammt, sollten die eindeutigere Antwort geben. Falls man hier Redundanz beobachtet, würde das bedeuten, daß sie die Gene auf den Chromosomen betrifft. Falls man jedoch nur in den entsprechend differenzierten Zellen viele identische Kopien findet, könnte es heißen, daß es zur selektiven Vermehrung eines einzelnen chromosomalen Gens kommt, unter Bildung vieler extrachromosomaler DNA-Fragmente.

## VIELFACH REPETIERTE DNA-SEQUENZEN

Eine allgemeinere Möglichkeit, sich wiederholende DNA-Sequenzen zu suchen, beruht auf Messung der Geschwindigkeit, mit der getrennte Einzelstränge mit ihren Komplementärsträngen unter Bildung von Doppelhelices hybridisieren. Mit Hilfe dieser Technik kann man leicht die Gene, die pro Genom nur in wenigen Exemplaren vorliegen, von denen unterscheiden, die in großer Zahl vorhanden sind. Überraschenderweise hat sich gezeigt,





Abschnitt einer Schlinge eines Lampenbürsten-Chromosoms von *Triturus*, der einen Gradienten von RNA-Ketten zunehmender Länge zeigt, die an ihrer DNA-Matrize hängen. Die schwarzen Punkte an den Haftstellen der RNA-Ketten sind RNA-Polymerase Moleküle. (Mit freundlicher Genehmigung von O. L. Miller und Barbara Beatty, Oak Ridge National Laboratory.)

ABBILDUNG 16-15

daß bestimmte Sequenzen 10.000 - 100.000 mal in einem einzigen Genom auftreten. Es ist völlig unklar, was diese sich wiederholenden Sequenzen codieren, da ihre Grundsequenz, die immer wieder repetiert wird, in bestimmten Fällen nur 300 Nukleotide lang ist. In manchen Spezies haben die sich wiederholenden Sequenzen eine andere Basenzusammensetzung als der Großteil der DNA; man kann sie also durch Zentrifugieren im CsCl-Gradienten leicht abtrennen. In diesen Fällen bezeichnet man die DNA als Satelliten-DNA. Eine Satellitenbande, die in einer Spezies vorhanden ist, scheint häufig in einer nahe verwandten Spezies völlig zu fehlen. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede jedoch nicht sehr bedeutungsvoll, sondern zeigen nur an, daß die Basenzusammensetzung des repetitiven Materials sich von der des Großteils der DNA nicht wesentlich unterscheidet.

Neue Versuche haben kürzlich gezeigt, daß einige repetitive Sequenzen bevorzugt innerhalb von Heterochromatinregionen liegen, und zwar allgemein in unmittelbarer Nähe des Zentromeren. Man weiß jedoch nicht, ob das bedeutet, daß alle diese DNA Sequenzen nur selten, oder nie, spezifische Aminosäuresequenzen codieren. Zur Klärung dieser Frage müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Zusätzlich zu den Sequenzen, die in so besonders großer Zahl auftreten, gibt es in vielen Organismen auch Hinweise auf Sequenzen (Gene), die 100 - 1000-fach im Genom vertreten sind. Man könnte sich vorstellen, daß alle Kopien von einer Art nebeneinander in den Schlingen oder Puffs angeordnet und zur gleichen Zeit aktiv sind.

## UNTERSCHIEDE IM DNA-GEHALT NAHE VERWANDTER SPEZIES

Nachdem man die Bedeutung der DNA für die Codierung erkannt hatte, erwartete man, daß, ausgehend von einfacheren zu komplexeren Organismen, die Menge von DNA pro haploidem Genom proportional zur tatsächlichen biochemischen Komplexität ansteigen würde. Das ist jedoch nicht immer der Fall. Während höhere Pflanzen und Tiere viel mehr DNA enthalten als die niederen (Abbildung 16-1), hatte niemand erwartet, daß bestimmte Fische und Amphibien 25 mal mehr DNA enthalten als irgendeine Säugetier-spezies. Als mehr und mehr Pflanzen untersucht wurden, stellte sich außerdem heraus, daß nahe verwandte Spezies sich manchmal in ihrem DNA-Gehalt um einen Faktor von 5 - 10 unterscheiden.

Diese Unterschiede entstehen im allgemeinen nicht dadurch, daß die Chromosomenzahlen steigen; statt dessen nimmt die Menge an DNA pro Chromosom zu. Man weiß nicht, wie das vor sich geht, aber es gibt Hinweise dafür, daß die Zunahme hauptsächlich durch eine Zunahme der Größe von hintereinander angeordneten funktionellen Genfamilien (Tandems) ent-

steht und nicht durch eine unverhältnismäßig ansteigende Menge der heterochromatischen Satellitensequenzen. Salamanderarten des Genus *Necturus*, die zu den Amphibien mit dem größten Nukleinsäuregehalt gehören, haben dementsprechend einige der längsten Lampenbürsten-Schlingen.

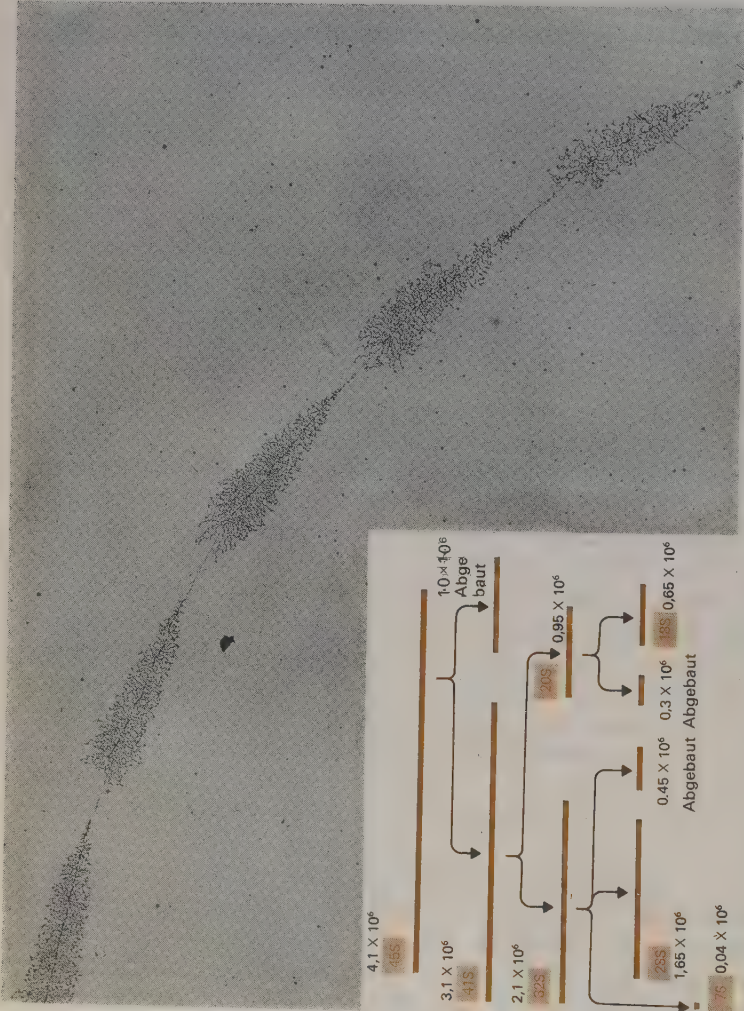
## DIE rRNA-SYNTHESE FINDET IM BEREICH DES NUKLEOLUS STATT

Ein Gen, für dessen Existenz in duplizierter Tandemform es eindeutige Hinweise gibt, ist das Gen, das rRNA codiert. Bei allen untersuchten Eukaryoten gibt es mindestens 100 bis 1000 Kopien auf einem oder mehreren Chromosomen. Diese DNA ragt gewöhnlich aus der Hauptmasse der Chromosomenfasern als Schlinge langgestreckter Fäden heraus; diese scheinen sich mit spezifischen Proteinen zum Nukleolus zu vereinen. Einige Organismen haben nur einen Nukleolus pro haploidem Chromosomensatz, andere enthalten mehrere. In jedem Fall sind die Nukleoli jedoch mit hochspezifischen Stellen auf den Chromosomen verbunden. Innerhalb jedes Nukleolus sind die multiplen rRNA-Gene hintereinander angeordnet (Abbildung 16-16) und jedes Gen hat ein Molekulargewicht von ca.  $8 \times 10^8$ . Sie werden getrennt transkribiert, wobei das rRNA Produkt bei 45S sedimentiert und ein Molekulargewicht von ca.  $4 \times 10^6$  hat.

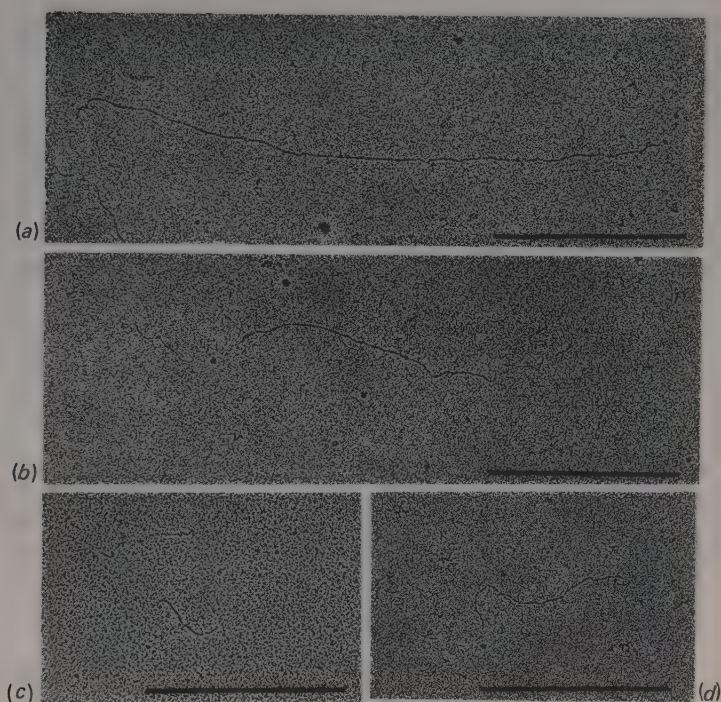
Diese 45S Moleküle sind die Vorstufen für die 28S und 18S rRNA-Ketten, die man in allen Eukaryoten-Ribosomen findet (Abbildung 16-17). Nach ihrer Loslösung von der DNA-Matrize werden die 45S Moleküle in mehreren Schritten zu rRNA-Molekülen der Größe, wie sie normalerweise in den Ribosomen vorkommen, abgebaut (Abbildung 16-16). Überraschenderweise findet man, daß fast die Hälfte der ursprünglichen 45S-Vorstufe nicht in die rRNA gelangt. Man nimmt an, daß der Anteil, der nicht im Ribosom auftaucht, durch intrazelluläre Nukleasen bis zu den Nukleotiden abgebaut wird.

Im Nukleolus verbindet sich die 28S Kette mit neu synthetisiertem ribosomalen Protein zur größeren (60S) Untereinheit. Die Synthese der ribosomalen Proteine findet nicht im Nukleolus statt; sie werden überhaupt nicht im Kern gemacht. Sie werden an zytoplasmatischen Polyribosomen synthetisiert und wandern nachträglich, auf noch unbekannte Weise, in den Nukleolus. Die kleineren 40S ribosomalen Untereinheiten von Eukaryoten werden dagegen anscheinend nicht im Nukleolus zusammengebaut. Es ist noch nicht bekannt, ob sie in einem anderen Teil der Kerns oder im Zytoplasma gebildet werden. Man weiß auch nicht, in welcher Form die mRNA in das Zytoplasma gelangt, ob als freie, an die 40S Untereinheit gebundene mRNA, als Teil eines Polyribosoms oder sogar an noch unbekannte Proteine gebunden, deren Hauptaufgabe der Transport von mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma wäre.





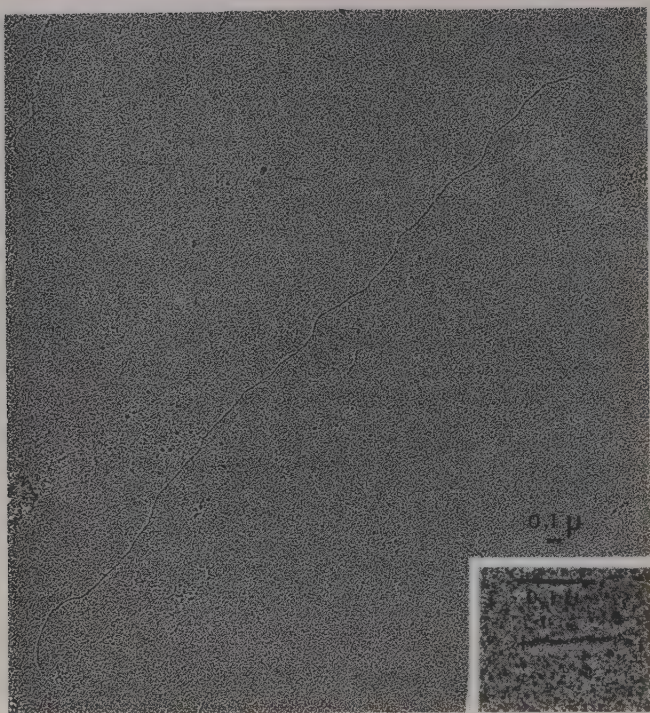




**ABBILDUNG 16-17** Elektronenmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zell-rRNA-Vorläufern und den reifen rRNA-Molekülen, die daraus entstehen a) = 45S, b) = 32S, c) = 18S, d) = 28S. Die Linie zeigt 1  $\mu$  an. (Mit freundlicher Genehmigung von N. Gramboulan und K. Scherrer, Schweizerisches Krebsforschungsinstitut Lausanne, Schweiz.)

#### EIN GROSSTEIL DER NEU SYNTHETISIERTEN RNA IN HÖHEREN ZELLEN LIEGT VORERST ALS TEIL SEHR GROSSER MOLEKÜLE VOR

Besonders große RNA-Moleküle, ähnlich denen, die an den Schlingen der Lampenbürsten transkribiert werden, werden auch in vielen anderen oder vielleicht allen Zellen höherer Pflanzen und Tiere gemacht. Möglicherweise stellen sie die einzige Form dar, in der mRNA synthetisiert wird. Es treten zwar auch kleinere Moleküle ( $<10^6$  MG) im Kern auf, aber viele oder alle davon entstehen möglicherweise durch Abbau größerer Vorstufen. Auch wenn die zytoplasmatische mRNA in einer bestimmten Zelle relativ klein ist (z.B. die 9S mRNAs der Hämoglobinkette von MG 17.000), ist es wahrscheinlich, daß sie zuerst als Teil einer äußerst langen Kette auftritt (Abbildung 16-18).



**ABBILDUNG 16-18** *Ein äußerst langes RNA-Molekül, das, aus dem Kern von Entenerythroblasten isoliert wurde. Der Ausschnitt zeigt ein kleineres (9S) Molekül, das von einem Entenretikulozyten-Polyribosom isoliert wurde und von dem man annimmt, daß es den Messenger für die Hämoglobinkette darstellt. (Mit freundlicher Genehmigung von N. Granboulan und K. Scherrer.)*

Die Möglichkeit, daß die entsprechende DNA-Matrize dieser äußerst langen mRNA-Vorläufer aus hintereinander angeordneten, gekoppelten repetitiven Genen besteht, ist sehr attraktiv. Falls sie zutrifft, könnten die langen mRNA-Vorstufen die direkten Produkte der repetitiven Gene darstellen; der endgültige Reifungsprozeß käme dann durch Nukleaseschnitte zwischen den einzelnen Messengern zustande.

#### **EIN GROSSTEIL DER RNA VERLASST NIEMALS DEN KERN**

Die Tatsache, daß ein Großteil der RNA, die ursprünglich in den äußerst großen Molekülen vorhanden ist, den Kern nie verläßt, um ein Teil von Polyribosomen zu werden, ist immer noch ziemlich geheimnisvoll. Eine

mögliche Erklärung wäre die, daß die Funktionsfähigkeit dieser Moleküle unter Translationskontrolle steht (siehe unten). Es könnte sein, daß sie sich nur in Gegenwart spezifischer, Induktor-ähnlicher Moleküle mit Ribosomen verbinden können; in deren Abwesenheit würden sie durch Nukleasen vollständig abgebaut werden. Andererseits könnten lange Abschnitte der Nukleotidsequenzen jedes großen Vorläufers keine Codierungsfunktion haben, sondern nur als Trennstücke (spacer) fungieren. Man weiß von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wie die der Abbildung 16-16, daß es solche spacer-DNA gibt. Diese Aufnahmen zeigen, daß die repetitiven Gene die rRNA codieren, im allgemeinen durch 5000 Basen oder mehr voneinander getrennt sind, was ungefähr zwei Drittel der Länge des rRNA-Gens ausmacht. Man weiß noch nicht, welchen selektiven Vorteil die spacer-Nukleotide zwischen den aufeinander folgenden rRNA-Genen haben.

Es besteht jedoch der Verdacht, daß spacer-DNA zwischen anderen Genen manchmal dazu dient, die Zeit zu messen. Die Einfügung von ca. 200.000 Basenpaaren (65 $\mu$ ) als spacer-DNA zwischen zwei Genen bewirkt z.B., daß sie im Abstand von mindestens 100 Minuten aktiv werden. Die Frage, ob ein Großteil der RNA, die nicht in das Zytoplasma gelangt, wirklich zur Zeitkontrolle dient, bleibt jedoch völlig offen.

#### **DIE LEBENSDAUER VON POLYRIBOSOMEN IN ZELLEN, DIE SICH RASCH TEILEN**

Im Vergleich dazu, was über bakterielle Messengers bekannt ist, wissen wir sehr wenig über die Lebensdauer funktionsfähiger mRNA in höheren Zellen. Viele scheinen eindeutig eine begrenzte Lebensdauer zu haben; für mRNA aus rasch wachsenden Hela-Zellen, die sich einmal am Tag teilen, wird häufig ein Schätzwert von 3 Stunden angegeben. Falls diese Zahlen stimmen, ist ihre relative Lebensdauer, der vieler bakterieller mRNA-Moleküle ähnlich, die sich ca. 10 mal während eines Zellzyklus erneuern.

#### **IN SICH NICHT TEILENDEN, DIFFERENZIIERTEN ZELLEN GIBT ES STABILE mRNA-MOLEKÜLE**

Im Gegensatz dazu scheint es immer wahrscheinlicher, daß ein beträchtlicher Teil der mRNA hochdifferenzierter Zellen höherer Tiere metabolisch stabil ist. Unreife Retikulozyten (rote Blutzellen) sind ein gutes Beispiel. Diese Zellen machen praktisch keine RNA während sie ihr Hauptprotein, Hämoglobin, synthetisieren. Falls ihre mRNA-Moleküle rasch gemacht und abgebaut würden, müßte man den Einbau von RNA Vorstufen in die



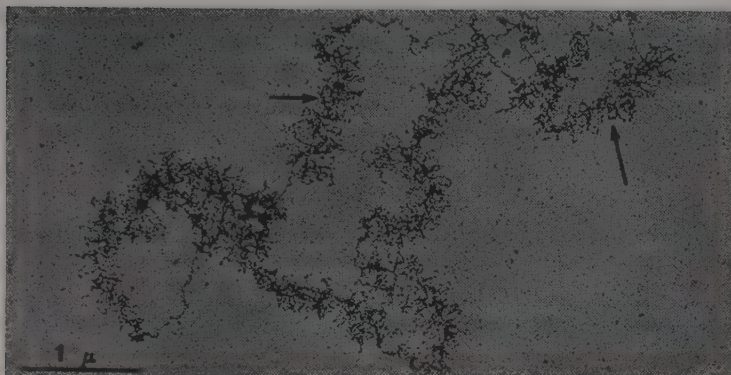
RNA nachweisen können, was nicht der Fall ist. Diese Stabilität hat einen offensichtlichen Vorteil, besonders da die konstante Umgebung einer roten Blutzelle, im Gegensatz zu den ständig wechselnden Wachstumsbedingungen für Bakterien, eine große Flexibilität überflüssig macht. Rote Blutzellen sind dazu bestimmt, hauptsächlich (>90%) Hämoglobin zu machen. Es besteht keine Veranlassung, die Hämoglobin-mRNA abzubauen, nur um sie wieder neu zu synthetisieren. Ganz ähnlich findet man, daß ein großer Teil der mRNA im Zytoplasma der Leberzellen von Erwachsenen hauptsächlich Plasmaproteine macht, die an die Zirkulation abgegeben werden. Ein großer Teil der zytoplasmatischen mRNA von Leberzellen ist dementsprechend relativ stabil. Es findet jedoch ein langsamer Austausch (turnover) statt, während dessen nicht nur mRNA, sondern auch die Ribosomen abgebaut werden. Neuere Messungen der Lebensdauer von Ribosomen liefern einen Wert von ca. 100 Stunden, also viel kürzer als die durchschnittliche Lebensdauer der Zelle von etwa 100 Tagen. Es wurde bis jetzt noch nicht untersucht, warum und auf welche Weise diese Prozesse ablaufen. Besonders rätselhaft ist der Abbau der rRNA. Man findet ihn zwar auch bei Bakterien, aber nur unter ungünstigen Nährstoffbedingungen. So weit wir wissen, findet jedoch der Abbau der rRNA in der Leber in völlig «normalen» Zellen statt.

### SELEKTIVE VERMEHRUNG VON rRNA-GENEN IN OOZYTEN

Die Zahl von rRNA-Genen in den Oozyten von Wirbeltieren ist ungefähr 100 bis 1000 mal größer als in anderen Wirbeltierzellen. Diese zusätzliche DNA ist jedoch nicht auf eine erhöhte Chromosomenzahl zurückzuführen, die bei  $4N$  bleibt, was charakteristisch für Oozyten vor der ersten meiotischen Teilung ist. Fast die gesamte Zunahme ist statt dessen auf eine große Zahl extrachromosomaler Nukleoli zurückzuführen. Jeder enthält ein einziges zirkuläres DNA-Molekül, dessen Länge von 20 bis  $1000\mu$  variiert. Dementsprechend gibt es eine große Zahl hintereinander angeordneter rRNA Gene; an jedem kann der 45S rRNA Vorläufer transkribiert werden. Abbildung 16-19 zeigt eine besonders elegante elektronenmikroskopische Aufnahme eines dieser extrachromosomalen Nukleoli, an dem über 1000 wachsende rRNA Vorläufermoleküle hängen.

Man weiß nicht, wie diese zirkuläre DNA synthetisiert wird, zumindest ein Exemplar muß jedoch von einem chromosomalen rRNA-Gen abstammen. Eine Möglichkeit, die man ernsthaft in Betracht ziehen muß, wäre die, daß eine Freisetzung durch Crossing-over erfolgt, ähnlich wie die Freisetzung von  $\lambda$ -Prophagen aus dem *E. coli*-Chromosom. Das könnte auch die großen Variationen in der Länge der nukleolaren DNA erklären, die man in einem





**ABBILDUNG 16-19** *Elektronenmikroskopische Darstellung eines extrachromosomalen nukleolaren Core aus einem Oozyten der afrikanischen Kröte *Xenopus laevis*. Es enthält 10 rRNA-Gene, die auf dem zirkulären DNA-Molekül hintereinander angeordnet sind. Die Pfeile zeigen die einzelnen Gene an. (Mit freundlicher Genehmigung von O. L. Miller und B. R. Beatty, Oak Ridge National Laboratory.)*

einzelnen Kern findet, da das Crossing-over an vielen hintereinander angeordneten Stellen entlang des entsprechenden Oozytenchromosoms stattfinden könnte.

Man kann nur Vermutungen darüber anstellen, warum Oozyten so viele rRNA-Gene brauchen. Höchst wahrscheinlich ist es eine Form der Anpassung an die Bedürfnisse einer raschen Proteinsynthese während der frühen Entwicklungsstadien, wenn die Zellteilung rascher als im späteren Leben erfolgt. So werden z.B. beim Frosch alle Ribosomen, die bis zur Gastrulation vorhanden sind, schon vor der Befruchtung des Oozyten synthetisiert. Ohne das Vorhandensein zusätzlicher rRNA-Gene wäre das vielleicht nicht zu erreichen.

#### DIFFERENZIERTE SOMATISCHE ZELLEN MIT EXTRACHROMOSOMALEN GENEN

Es gibt mehr und mehr Arbeiten, die über eine selektive Vermehrung und Freisetzung von Genen in somatischen Zellen berichten. Die meisten überzeugenden Hinweise betreffen das polytäre Riesenchromosom von Insekten. Verschiedene Banden (Gene?) nehmen während spezifischer Entwicklungsstadien nicht nur an Größe zu, sondern, was vielleicht noch wichtiger ist, ein beträchtlicher Teil der neu synthetisierten DNA wird von dem spezifischen Chromosom freigesetzt! Diese Beobachtungen wurden zuerst fast allgemein

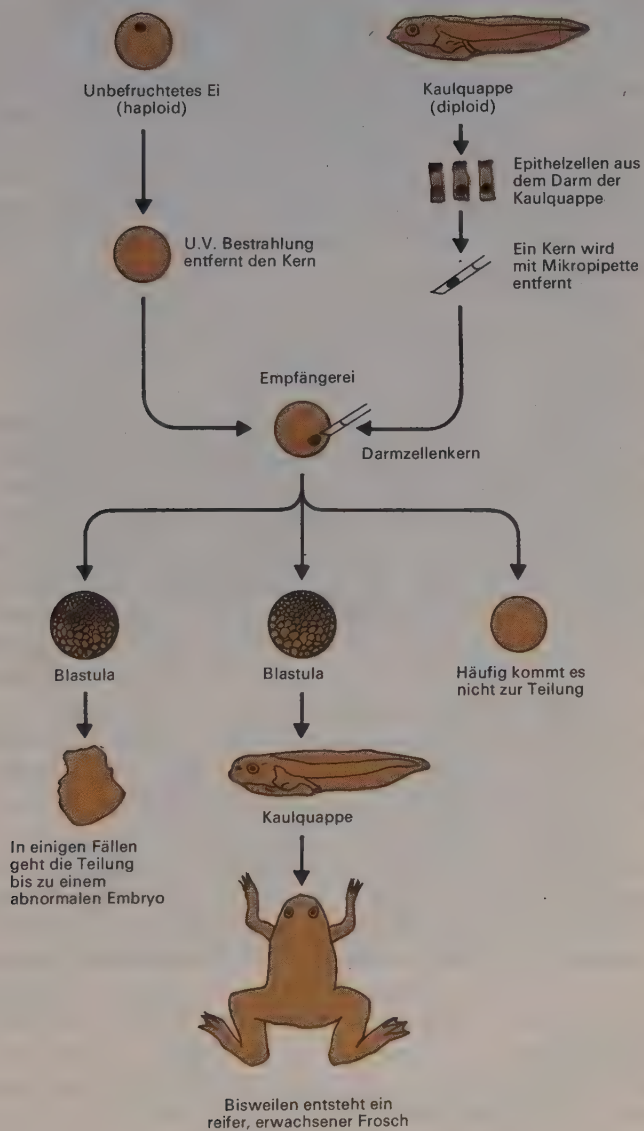
ignoriert; heute jedoch und angesichts der wunderschönen, elektronenmikroskopischen Aufnahmen extrachromosomaler nukleolarer DNA, scheint man die Möglichkeit nicht mehr außer Acht lassen zu können, daß die Synthese vieler anderer Genprodukte in großem Maßstab durch Erzeugung mehrerer Kopien ihrer DNA-Matrizen erreicht wird.

### **DIE DIFFERENZIERUNG IST AUF DER EBENE DES KERNS IM ALLGEMEINEN NICHT IRREVERSIBLE**

Selbst wenn sich die selektive Vermehrung von Genen als allgemein wichtig für die Differenzierung herausstellen sollte, sprechen Versuche mit verpflanzten Kernen eindeutig dagegen, daß die extrachromosomale DNA eine Zelle notwendigerweise irreversibel auf die selektive Synthese einer beschränkten Anzahl von Genprodukten festlegt. In diesen Versuchen wurden diploide Kerne differenzierter Zellen auf unbefruchtete Eier verpflanzt, deren haploide Kerne vorher entfernt wurden. Die dabei entstandenen, genetisch vollständigen diploiden Eier wurden dann künstlich zur Teilung und zum Wachstum gebracht; häufig bildeten sich erwachsene Organismen, deren Chromosomen durch klonale Vermehrung ausschließlich vom Spenderkern abstammen (Abbildung 16-20). Der Frosch ist der komplexeste Organismus, bei dem die Kerntransplantations bisher eine «klonale» Reproduktion erlaubt hat. Die Erfolge sind hier hauptsächlich auf die Größe des Amphibieneies zurückzuführen, die die Entfernung des mütterlichen Kerns mit üblichen mikrochirurgischen Methoden erlaubt. Es ist jedoch zu erwarten, daß man, falls erwünscht, schließlich bei praktisch allen Wirbeltieren zu positiven Ergebnissen kommen wird.

### **EINE IRREVERSIBLE ZYTOPLASMATISCHE DIFFERENZIERUNG GEHT MIT DEM VERLUST DER TEILUNGSFÄHIGKEIT EINHER**

Viele Zellen enthalten Kerne, die sich unter normalen Bedingungen niemals mehr teilen werden. Häufig stellen diese Zellen Beispiele äußerster Differenzierung dar, wobei ein großer Teil der gesamten Synthese nur wenigen verschiedenen Proteinen dient. Reife rote Blutzellen (Erythrozyten) sind vielleicht das eindrucksvollste Beispiel. Diese Zellen teilen sich niemals; ihre einzige Aufgabe ist die Synthese von Hämoglobinmolekülen, die sich reversibel mit Sauerstoff verbinden können. In einigen Spezies, einschließlich aller Säugetiere, zerfällt der Kern dieser Zellen sogar mit der Zeit, wodurch die entstehenden reifen Erythrozyten die Fähigkeit verlieren, weiteres Hämoglobin zu machen. Erythrozyten leben im allgemeinen nur einige Monate



**ABBILDUNG 16-20** Schritte bei der Entstehung eines «klonalen» Frosches (Zeichnung nach J. R. Gurdon, Scientific American, Dezember 1968).

und müssen durch neu entstandene Zellen ersetzt werden. Ähnlich ist auch das Verhalten reifer Plasmazellen, die spezifisch Antikörper produzieren. Sie teilen sich ebenfalls nicht mehr, sondern synthetisieren ihr Produkt während einiger Tage und sterben dann. Während dieser Zeit bleibt ihr Kern voll funktionsfähig und produziert die mRNA-Moleküle, die das Antikörperprodukt codieren. Im Gegensatz dazu leben viele andere spezialisierte Zellen (z.B. Nervenzellen) viele, viele Jahre, obwohl sie sich nie teilen. Die Funktionsfähigkeit dieser langlebigen Zellen hängt immer von der Anwesenheit eines Kernes ab, der mRNA produzieren kann. Eine gewisse Proteinsynthese, wenn auch in geringem Ausmaß, scheint für die fortgesetzte Funktionsfähigkeit aller Zellen notwendig zu sein.

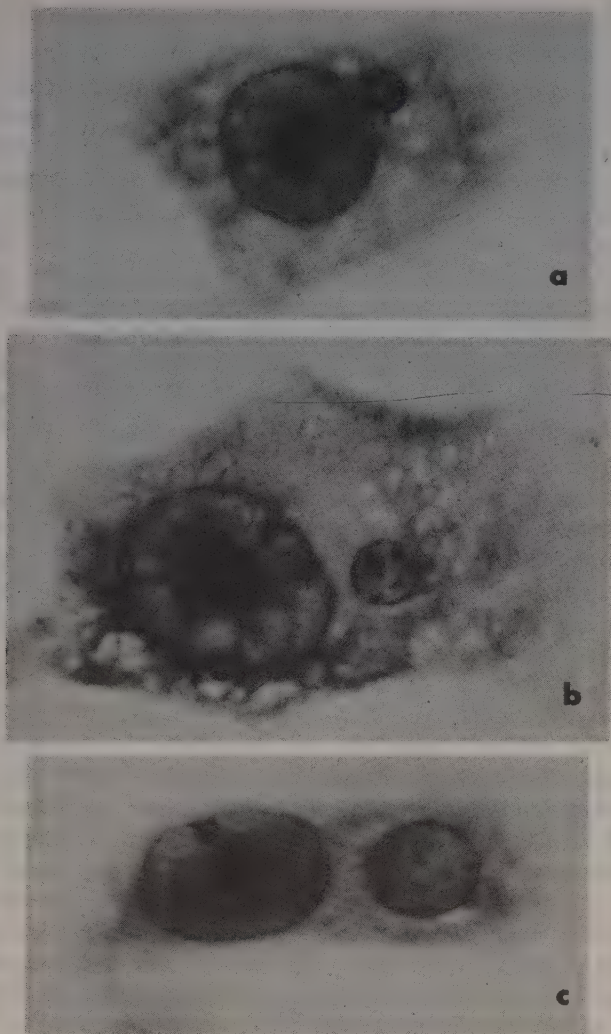
#### REAKTIVIERUNG RUHENDER KERNE DURCH FUSION MIT AKTIVEN ZELLEN

Der Ruhezustand vieler Kerne wird beendet, wenn die entsprechenden Zellen mit anderen Zellarten fusioniert werden. Bis vor wenigen Jahren war die Fusion von Zellen in Gewebekultur ein seltenes Ereignis, das die Biologen nicht willkürlich auslösen konnten. Dann wurde jedoch die Beobachtung gemacht, daß die Adsorption bestimmter Viren, besonders des Influenza-ähnlichen Sendaivirus, viele Zellen zur Verschmelzung brachte. Die Viruspartikel verändert die Zelloberflächen auf eine Weise, die die Fusion fördert.

Noch wichtiger ist, daß UV-inaktivierte Viren die Fusion ebenfalls fördern können, weshalb der Stoffwechsel der fusionierten Zellen untersucht werden kann, ohne die vielen störenden Einflüsse, die für Virusinfektionen charakteristisch sind. Mit Hilfe des Sendaivirus können sinnvolle Zellfusionsversuche heute leicht durchgeführt werden, aus denen man bereits wichtige neue Erkenntnisse über die Regulationsvorgänge höherer Zellen gewonnen hat.

Wenn ein kernhaltiger Hühnererythrozyt z.B. mit Zellen der menschlichen Gewebekulturlinie HeLa verschmolzen wird, nimmt der Erythrozytenkern sowohl die DNA- als auch die RNA-Synthese wieder auf. Die Reaktivierung des Kerns beginnt mit einem Volumszuwachs, wodurch die dicht gepackten Hühnerchromosomen sich strecken und RNA synthetisieren können (Abbildung 16-21). Auf noch unbekannte Weise stellt das Zytoplasma der HeLa-Zelle dem Hühnerkern Komponenten zur Verfügung, die es ihm erlauben, seine Funktion erneut aufzunehmen. Oberflächlich betrachtet, müssen daher DNA- und RNA-Synthese unter einer Form positiver Kontrolle stehen. Wenn nämlich ein negativer Kontrollmechanismus vorläge, würde das Zytoplasma des Erythrozyten den HeLa-Kern an seiner Funktion hindern. Man findet jedoch keine derartige Hemmung, weder bei dieser Zellkombination noch bei anderen, die bisher untersucht wurden. Die Hypothese, daß die DNA-Syn-





**ABBILDUNG 16-21** a) Eine kürzlich fusionierte Zelle, die einen sehr kleinen Hühnerythrozytenkern und einen HeLa-Kern enthält. b) Ein späteres Stadium, das die Vergrößerung des Erythrozytenkerns zeigt. c) Ein noch späteres Stadium: die Vergrößerung ist noch stärker ausgeprägt. (Aufnahmen von Dr. H. Harris, Reproduktion mit Erlaubnis des J. Cell. Science.)

these unter positiver Kontrolle steht, wird außerdem durch Versuche unterstützt, bei denen eine HeLa-Zelle in der  $G_1$ -Phase verschmolzen wird. Kurz nach der Fusion beginnt die DNA-Synthese im vorher ruhenden  $G_1$ -Kern.

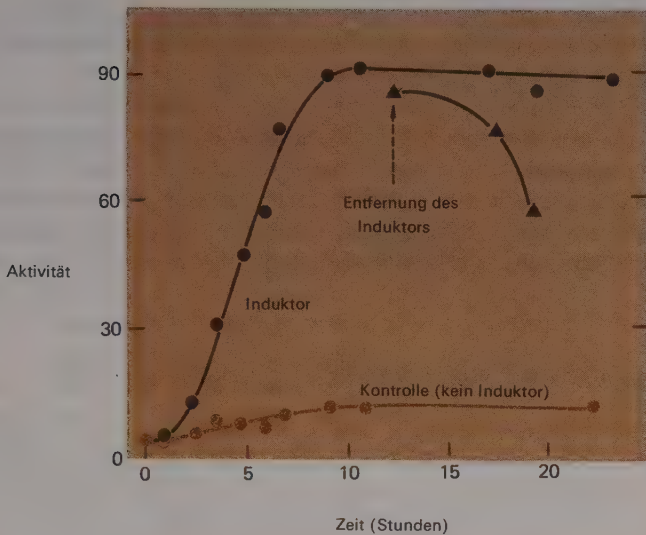
## POSITIVE KONTROLLE DER GENFUNKTION

Eine ganz zentrale Frage ist daher, welche Substanzen spezifische Gene höherer Organismen direkt aktivieren. Wir wissen fast gar nichts darüber. Während die Zugabe bestimmter Substanzen die DNA-Synthese initiiert oder die Synthese wohldefinierter Proteine stimuliert, weiß man nicht, auf welche Weise das vor sich geht. Am besten wurden einige Fälle untersucht, an denen Hormone beteiligt sind. So führt z.B. die Zugabe von Östrogen zu Uterusgewebe rasch zur Stimulation der RNA-Synthese. Die eigentlichen Moleküle, die mit Östrogen in Wechselwirkung treten, sind jedoch nicht bekannt. Es ist anzunehmen, daß Östrogen direkt auf der Ebene des Chromosoms wirkt, wodurch einige Gene für die Transkription der RNA zugänglich werden, andererseits könnte es aber auch nur auf die Zelloberfläche wirken, wodurch Stoffwechselvorgänge ausgelöst werden könnten, die schließlich die RNA-Synthese beeinflussen.

Man hat sich zum Ziel gesetzt, ein *in vitro* System zu finden, in dem Hormone unmittelbar die DNA- oder RNA-Synthese beeinflussen. Leider wurde bisher noch kein sauberes System ausgearbeitet. Es gibt jedoch Gewebekulturzellen, die spezifisch auf Hormone reagieren. Eine der bestuntersuchten Zelllinien stammt aus Hepatomen (Lebertumoren). Wenn Hepatomzellen in Gegenwart von Nebennierenrindenhormonen gezüchtet werden, beobachtet man eine fünf- bis fünfzehnfache Steigerung des Enzyms Tyrosin-Aminotransferase im Vergleich mit Kontrollen ohne Hormon (Abbildung 16-22). Diese Stimulation ist hochspezifisch, da das Ausmaß der Gesamtsynthese von RNA und Protein durch die Zugabe des Hormons nicht beeinflußt wird. Die Steigerung der Aktivität ist außerdem auf neu synthetisiertes Protein zurückzuführen, da sie nicht erfolgt, wenn man Inhibitoren der Proteinsynthese wie Puromycin oder Cykloheximid zusetzt. Es ist jedoch völlig unbekannt, ob die Induktion die Synthese neuer mRNA-Moleküle erfordert oder ob das Hormon auf irgendeine Weise die Translation bereits vorhandener mRNA-Matrizen beeinflußt. Man sieht also wieder, daß zuerst unbedingt geeignete *in vitro* Systeme ausgearbeitet werden müssen, bevor die Frage beantwortet werden kann.

## PRÄFORMIERTE mRNA AUF DEM WEG ZUR GASTRULATION

Es ist noch nicht bekannt, ob eine Translationskontrolle im Leben eines Eukaryoten eine wesentliche Rolle spielt. Der offensichtliche Gedanke «Warum sollte man Energie auf die Synthese eines RNA-Moleküls verschwenden, das man vielleicht niemals brauchen wird?», könnte für eine Bakterienzelle eine größere Gültigkeit als für kernhaltige Zellen haben, in denen



**ABBILDUNG 16-22** Induktion der Tyrosin-Aminotransferase in Rattenhepatomzellen durch das synthetische Nebennierenrindenhormon Dexamethasonphosphat.

es eventuell viel länger dauert, bis neu synthetisierte mRNA-Moleküle für die Proteinsynthese geeignete Positionen erreichen. Eine rasche Stoffwechseländerung höherer Zellen könnte daher das Vorhandensein präformierter vollständiger mRNA-Ketten an geeigneten Stellen im Zytoplasma erfordern. Dadurch könnte die Proteinsynthese sofort nach Empfang eines molekularen Signals einsetzen.

Diese Situation findet man tatsächlich in unbefruchteten Eiern von Echinodermen, die unmittelbar nach der Befruchtung mit hoher Geschwindigkeit Protein synthetisieren. Die meisten mRNA-Ketten, die bis zur Gastrulation verwendet werden, wurden schon vor der Befruchtung synthetisiert; eine nachträgliche Hemmung der RNA-Synthese mit Actinomycin verhindert daher keineswegs die frühen Teilungsschritte. Man muß daraus schließen, daß das unbefruchtete Ei reichlich mit mRNA versehen ist, die auf ein Signal wartet, um ihre Matrizenfunktion zu beginnen. Dieses Signal wird nicht durch Kontrolle der Zahl von Ribosomen vermittelt, da diese ebenfalls in großer Anzahl vorhanden sind. Die meisten Ribosomen sind jedoch nicht mit mRNA zu Polyribosomen verbunden. Statt dessen führt die Befruchtung zu einem Signal, das spezifisch die Polyribosomenbildung ermöglicht, wodurch die rasche Folge von Spaltungsteilungen in Gang gesetzt wird, die zuerst zur Blastulation und schließlich zur Gastrulation führt. Während

der gesamten frühen Spaltungsteilungen werden einige neue mRNA-Spezies synthetisiert, die hauptsächlich zur Funktion während des Gastrulastadiums bestimmt sind.

Das Vorhandensein präformierter mRNA in unbefruchteten Eiern wirft sofort die Frage auf, ob dies auch häufig in anderen Zellen vorkommt. Bevor diese Frage angegriffen werden kann, muß jedoch der Zustand der präformierten RNA im Ei aufgeklärt werden. Es gibt Behauptungen, daß sie mit spezifischen Proteinen verbunden ist, aber keines der Experimente ist wirklich überzeugend. Es ist zu hoffen, daß es bald verlässliche Versuche geben wird.

### WEITERE AUFLÄRUNG DES EUKARYOTENCHROMOSOMS

Aus allem bisher Gesagten wird klar, daß die Molekularbiologen die Embryologie nicht mehr als hoffnungsloses Problem ansehen, das nur zu experimentell grundsätzlich unbeweisbaren Theorien führt. Wenn die richtigen Fragen gestellt werden, kann man auch auf molekularer Ebene gültige Antworten erhalten, wenn auch nach sehr harter Arbeit. Der Grund für diesen neuen Optimismus liegt in der Entdeckung der  $\sigma$ -Faktoren und der Entwicklung wohldefinierter Theorien über die positive Kontrolle der Genfunktion. Die dringlichste Aufgabe ist es nun, geeignete höhere Zellen zu finden, mit denen man die neuen Vorstellungen über Kontrollmechanismen überprüfen kann. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beruhen diese Vorstellungen fast ausschließlich auf prokaryotischen Systemen. Auf der Suche nach einem geeigneten System ist die Wahl eines Versuchsorganismus vorrangig, dessen Chromosomen im Detail sowohl auf genetischer als auch auf molekularer Ebene untersucht werden können. Sobald diese Organismen gefunden sind, wird die Embryologie endlich einen soliden molekularbiologischen Kurs einschlagen.

### ZUSAMMENFASSUNG

*Über die molekulare Grundlage der Kontrolle der Proteinsynthese in Zellen vielzelliger höherer Organismen ist leider viel zu wenig bekannt. Insbesondere gibt es wenig Information über die Mechanismen, die zur Zelldifferenzierung führen. Wenn eine Zelle einmal differenziert ist, fahren im allgemeinen alle ihre Nachkommen fort, eine spezifische Gruppe ganz bestimmter Proteine zu synthetisieren. Es gibt Hinweise, daß diese selektive Proteinsynthese, wie bei Mikroben, auf der selektiven Synthese ganz bestimmter RNA-Typen beruht. Differenzierte Zellen müssen daher über Mechanismen verfügen, die die Ablesegeschwindigkeit spezifischer DNA-Bereiche kontrollieren. Eines*



der Haupthindernisse vor einem grundlegenden Verständnis ist die augenblickliche Unfähigkeit, Differenzierung außerhalb eines intakten Organismus auf einfache Art und Weise zu untersuchen. Man kann zwar die embryonale Differenzierung in Gewebekultur ablaufen lassen, es ist jedoch bisher noch nicht gelungen, die spezifischen äußeren Faktoren zu isolieren, die normalerweise eine Zelle zur Differenzierung in einer bestimmten Richtung veranlassen.

In Bakterien wird der Differenzierungsvorgang, der zur Sporenbildung führt, durch suboptimale Nahrungsbedingungen ausgelöst. Dieses Signal löst eine Serie von Ereignissen die zum Verschwinden von einem oder mehreren der normalen RNA-Polymerase  $\sigma$ -Faktoren führen; statt dessen tritt ein Sporulations-spezifischer  $\sigma$ -Faktor auf, der nur die Gene erkennt, die an der Sporenproduktion beteiligt sind. Man wird vielleicht bald untersuchen können, ob ein ähnlicher zeitweiliger Ersatz eines  $\sigma$ -Faktors auch die Grundlage für andere Differenzierungsvorgänge darstellt (z.B. den Lebenszyklus des Schleimpilzes, Metamorphose von Insekten).

Es herrscht noch immer eine große Diskrepanz zwischen dem, was wir über Eukaryoten (kernhaltige Zellen) wissen und dem, was über die einfacheren Prokaryoten bekannt ist. Die Evolution der Eukaryotenzelle brachte eine völlig neue Methode für die Trennung der Chromosomen, die Spindel, mit sich, das Auftreten des Zentromeren und das Abdecken vieler Gene durch Histon. Sowohl die Struktur höherer Chromosomen als auch die Weise, in der ihre DNA-Replikation an vielen verschiedenen Stellen auf einem einzigen Chromosom beginnen kann, sind noch immer fast völlig ungeklärt. Es gibt Hinweise für eine beträchtliche Redundanz der Gene, aber der einzige gut dokumentierte Fall betrifft die Gene, die rRNA codieren. Eine große Zahl von rRNA-Genen werden hintereinander angeordnet in einzelnen oder in mehreren Nukleoli somatischer Zellen in Verbindung mit dem Chromosom gefunden. Viele Oozyten enthalten ebenfalls große Zahlen extrachromosomaler Nukleoli; jeder von ihnen enthält ein zirkuläres DNA-Molekül, das aus 10 bis 1000 hintereinander liegenden rRNA-Genen besteht. Es gibt starke Hinweise dafür, daß in vielen somatischen Zellen von Insekten sich auch andere Gene selektiv vermehren und extrachromosomale Kopien bilden. Dieser sehr wichtige Punkt ist jedoch noch nicht wirklich bewiesen. In vielen hoch spezialisierten Zellen teilen sich die Kerne normalerweise nicht. Das ist jedoch kein Ausdruck dafür, daß der Kern irreversibel differenziert ist, da diese Kerne manchmal wieder aktiv werden, wenn sie in ein weniger differenziertes Zytoplasma eingebracht werden, entweder durch Mikroeingriffe oder durch die Technik der Zellfusion. Das Verhalten des Kerns ist daher stark von molekularen Signalen abhängig, die aus dem umgebenden Zytoplasma empfangen werden. Obwohl man weiß, daß bestimmte Hormone die DNA- oder die RNA-Synthese selektiv beeinflussen, ist nichts darüber bekannt, wo oder wie sie eingreifen. Obwohl man glaubt, daß ein Großteil der Kontrolle der Proteinsynthese in höheren Organismen auf

der Ebene der Transkription einsetzt, ruhen im unbefruchteten Ei viele fertig synthetisierten mRNA-Moleküle bis zum Augenblick der Befruchtung. Es bleibt zu klären ob «Translationskontrolle» eine wichtige Rolle im Leben einer somatischen Zelle spielt.

## LITERATUR

- Sussman, M., *Growth and Development*, 2. Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964. Eine kurze Taschenbuch-Einführung in die Embryologie, die die Probleme des klassischen Embryologen mit den Ideen der modernen Genetik verbindet.
- Ebert, J., *Interacting Systems in Development*, 2. Aufl., Holt, New York, 1970. Eine ausgezeichnete, recht detaillierte Taschenbuch-Einführung in die Embryologie, die betont, wie wünschenswert eine Erklärung auf molekularer Ebene wäre.
- Brachet, J., *Biochemical Cytology*, Academic, New York, 1957. Eine ausgezeichnete, nun leider teilweise überholte Übersicht über die biochemischen Fakten, die für Fragen der Zytologie und der Embryologie wichtig sind.
- The Bacterial Spore*, G. W. Gould und A. Hurst (Eds.), Academic, New York, 1969. Eine äußerst gründliche Zusammenfassung des neuesten Standes der Forschung über bakterielle Sporen.
- Losick, R., und A. L. Sonenheim, «Changes in the Template Specificity of RNA Polymerase During Sporulation» *Nature* **224**, 35 (1969). Sigma-Faktoren und der erste wirkliche Zugang zum Verständnis der Differenzierung von Sporen.
- Organization and Control in Prokaryotic and Eukaryotic Cells*: Twentieth Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press, London, 1970. Eine neue Sammlung von Arbeiten mit Betonung der besonderen Eigenschaften von Eukaryoten.
- Roodyn, D., und D. Wilkie, *The Biogenesis of Mitochondria*, Methuen, London, 1968. Einführung in die Mitochondrien, mit Betonung der genetischen Eigenschaften.
- Cells and Tissues in Culture* (3-bändig), E. N. Willmer (Ed.), Academic, New York, 1965. Eine breitangelegte und äußerst vollständige Übersicht über Ideen und Methoden der Gewebekultur.
- Beermann, W., und O. Clever, «Chromosome Puffs», *Sci. Am.*, April, 1964. Sehr gut illustrierte Diskussion über die Funktion der Riesenchromosomen von Insekten.
- Gall, J. G., «Chromosomes and Cytodifferentiation», in M. Lock (Ed.), *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, Academic, New York, 1963. Eine Übersicht, die eine ausgezeichnete Einführung in die Lampenbürsten-Chromosomen enthält.
- Brown, S. W., «Heterochromatin», *Science*, **151**, 477 (1966). Übersichtsartikel, der den allgemeinen Leser in die vielen Probleme dieser hochkondensierten Form des Chromosomenmaterials einführt.
- Thomas, C. A., «The Theory of the Master Gene», in *Neurosciences II: A Study Program*, Rockefeller University Press, 1970. Ein phantasievoller Artikel, der sich mit der Bedeutung der Genredundanz für das Leben höherer Organismen auseinandersetzt.
- Britten, R. J., und D. A. Kohne, «Repeated Sequences of DNA», *Sci. Am.*, April, 1970. Beweise für das Vorhandensein repetitiver Sequenzen in vielen verschiedenen Organismen.

- Brown, D. D., «The Genes for Ribosomal RNA and Their Transcription during Amphibian Development», *Current Topics Develop. Biol.* **2**, 47 (1967). Eine klare Zusammenfassung der Versuche, die gezeigt haben, daß Nukleoli die Orte ribosomaler RNA-Synthese darstellen.
- «Nuclear Physiology and Differentiation», *Genetics*, **61**, Suppl. (1969). Eine Sammlung von Arbeiten über die Frage der Genfuktion in höheren Organismen.
- Miller, O. L., Jr., und B. R. Beatty, «Portrait of a Gene», *J. Cell. Physiol.*, **74**, Suppl. 1, 225 (1969). Eine Zusammenfassung der außergewöhnlich schönen elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Autoren; sie zeigen Amphibiengene während der Synthese von RNA-Ketten.
- Brown, D. D., und I. B. David, «Developmental Genetics», *Ann. Rev. Genetics*, **3**, 127 (1969). Ein Übersichtsartikel über alle Aspekte der Embryologie, die auf molekularer Ebene vielversprechend zu sein scheinen.
- Gurdon, J. B., «Transplanted Nuclei and Cell Differentiation», *Sci. Am.*, Dezember, 1968. Eine Beschreibung der bedeutendsten Kerntransplantationsversuche, die bisher durchgeführt wurden.
- Harris, H., *Nucleus and Cytoplasm*, Clarendon Press, Oxford, 1968. Eine Einführung in die Kontrollprobleme bei höheren Organismen, die die große Bedeutung von Zellfusionsexperimenten unterstreicht.
- Ephrussi, B., und M. Weiss, «Hybrid Somatic Cells», *Sci. Am.*, April, 1969. Eine Einführung in die Kontrollprobleme bei höheren Organismen, die die Bedeutung der Zellfusionstechnik betont.
- Harris, H., *Cell Fusion*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1970. Die neueste Zusammenfassung über das Gebiet der Zellfusion.
- Krooth, R. S., G. A. Darlington und A. A. Velazques, «The Genetics of Cultured Mammalian Cells», *Ann. Rev. Genetics*, **2**, 141 (1968). Ein ausgezeichnete Übersichtsartikel für Fortgeschrittene über die Verwendung von Hybridzellen für Untersuchungen der Säugetiergenetik.
- Tompkins, G. M., T. D. Gelehrter, D. Grannner, D. Martin, H. Samuels und E. Thompson, «Control of Specific Gene Expression in Higher Organisms», *Science*, **166**, 1474 (1969). Ein Aufsatz über die Induktion von Enzymen in Gewebekulturzellen, in dem die Möglichkeit einer Translationskontrolle bevorzugt wird.
- Gross, P., «The Control of Protein Synthesis in Embryonic Development and Differentiation», *Current Topics Develop. Biol.*, **2**, 1 (1967). Ein Übersichtsartikel, der den RNA-Stoffwechsel in frühen Stadien der Entwicklung betont.
- Davidson, E. H., *Gene Activity in Early Development*, Academic, New York, 1969. Eine vollständige Übersicht über neuere biochemische Untersuchungen, die sich auf die Embryologie beziehen.

# 17

## DAS PROBLEM DER ANTIKÖRPERSYN- THESE

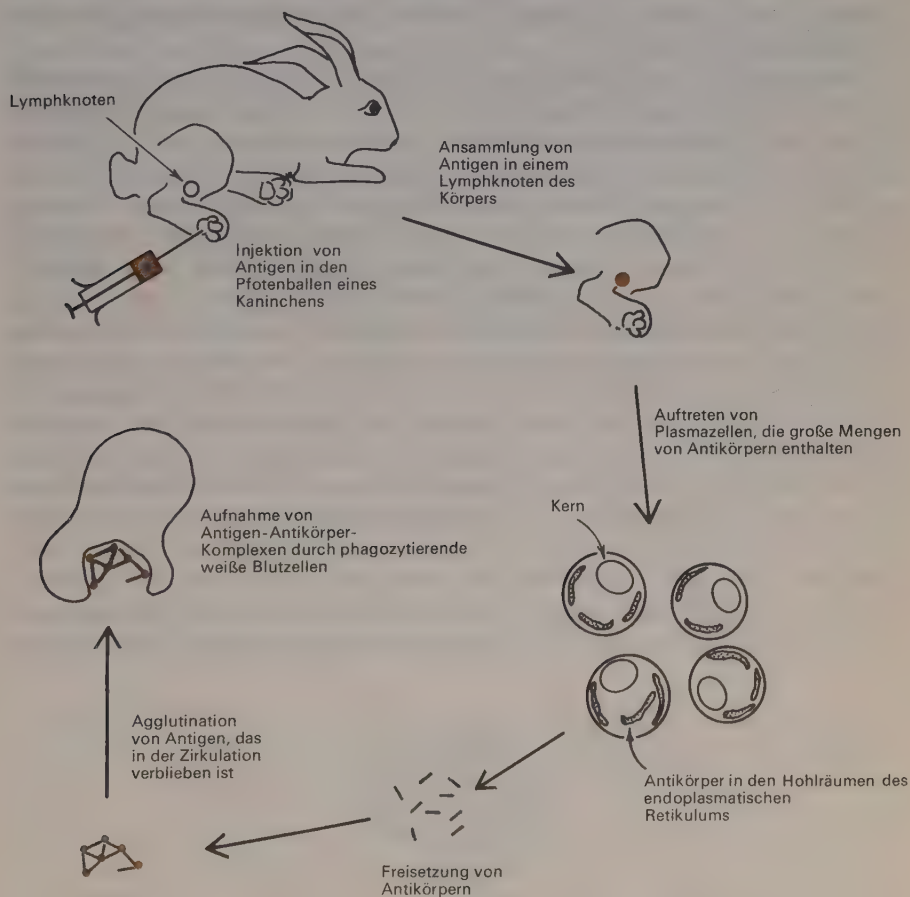
Die Frage, auf welche Weise Organismen spezifische Immunreaktionen geben können, hat die Biologen während unseres ganzen Jahrhunderts beschäftigt. Das Interesse war ursprünglich auf rein praktische Erwägungen zurückzuführen. Je besser man Antigene und Antikörper versteht, umso leichter könnte es sein, unsere immunologischen Reaktionen bei der Verteidigung gegen gefährliche Krankheitserreger zu verbessern. In den letzten Jahren konzentrierte sich jedoch die Aufmerksamkeit vor allem deshalb auf die Immunologie, weil man erkannte, daß die Induktion einer spezifischen Antikörpersynthese eine spezifische, irreversible Differenzierung der Zelle bedeutet. Die Tatsache, daß Methoden verfügbar wurden, die die Isolierung großer Mengen hochgereinigter Antikörper erlauben, war besonders attraktiv und ermöglichte chemische Arbeiten über ihre genaue Struktur. Heute glaubt man, daß das Verständnis der Antikörpersynthese auf molekularer Ebene einen bedeutenden Durchbruch bedeuten würde, und zwar nicht nur in bezug auf die Medizin, sondern auch wegen all ihrer Aspekte der Biologie vielzelliger Organismen.

### ANTIGENE SIND SUBSTANZEN, DIE DIE ANTIKÖRPERSYNTHESE STIMULIEREN

Die Antikörpersynthese ist eine Abwehrreaktion höherer Wirbeltiere, die die schädlichen Effekte pathogener Mikroorganismen zu bekämpfen hilft. Antikörper erfüllen diese Aufgabe durch Verbindung mit den Mi-



kroorganismen unter Bildung von Komplexen, die dann durch Phagozytose zerstört werden. Unter Phagozytose versteht man das Verschlingen durch bestimmte weiße Blutzellen, wie z.B. Makrophagen, die eine Art von Müllabfuhr im Körper bewirken (Abbildung 17-1). So stimuliert das Eindringen eines Virus in die Zirkulation eines höheren Wirbeltieres die Produktion spezifischer Antikörper, die sich spezifisch mit den Viruspartikeln verbinden und ihre weitere Vermehrung verhindern. Ein Individuum ist so lange gegen ein Virus immun, solange die entsprechenden Antikörper in seiner Zirkulation vorhanden sind. Was immer die Synthese spezifischer Antikörper hervorruft



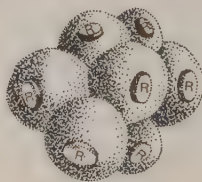
**ABBILDUNG 17-1** Schematische Darstellung der Sequenz von Vorgängen, die zwischen der Injektion eines Antigens und dem Auftreten zirkulirender Antikörper ablaufen.

(z.B. eine Viruspartikel) wird *Antigen* genannt. Die Untersuchung von Antikörpern und ihrer Wechselwirkung mit Antigenen bezeichnet man als *Immunologie*.

Eine Substanz ist dann potentiell ein Antigen, wenn sie auf ihrer Oberfläche eine Anordnung von Atomen trägt, die sich von der Oberflächenkonfiguration jeder normalen Wirtszellkomponente unterscheidet. Das immunologische Abwehrsystem basiert daher auf der Fähigkeit eines Organismus, zwischen seinen eigenen und fremden Molekülen zu unterscheiden. Antikörper gegen ein Virus werden nicht deshalb synthetisiert, weil das System erkennt, daß das Virus zu einer Krankheit führen wird, sondern weil es erkennt, daß das Virus ein fremdes Objekt ist, das folglich aus der Zirkulation eliminiert werden muß.

Daraus ergibt sich unmittelbar die Frage: Welche Bedingungen muß ein Stoff erfüllen, um antigene Eigenschaften aufzuweisen? Eins der Hauptfordernisse ist, daß ein Antigen entweder ein Makromolekül oder aus Makromolekülen aufgebaut sein muß (z.B. eine Viruspartikel). Die meisten Proteine und einige Polysaccharide und Nukleinsäuren sind Antigene. Kleine Moleküle können von selbst selten spezifische zirkulierende Antikörper induzieren. Das Ausbleiben einer Immunreaktion gegen kleine Moleküle ist nicht auf einen Mangel an Spezifität zurückzuführen. Viele kleinen Moleküle, die selbst nicht antigen sind, verändern die antigenen Eigenschaften eines großen Moleküls, wenn sie kovalent an dieses (z.B. ein Protein) gebunden sind.

Es scheint unwahrscheinlich, daß die gesamte Oberfläche eines großen Moleküls für seine Antigenität erforderlich ist. Höchstwahrscheinlich reagiert das immunologische System auf spezifische Atomgruppierungen (antigene Determinanten), die an verschiedenen Stellen auf der Moleküloberfläche angeordnet sind (Abbildung 17-2). Ein bestimmtes Proteinmolekül induziert daher meistens die Bildung mehrerer Arten von Antikörpern, während Antigene von der Größe von Bakterien eine sehr große Zahl verschiedener antigenen Determinanten besitzen. Wir wissen heute noch immer nicht genau, wie viele distinkte antigene Determinanten es gibt. Die Zahl ist bestimmt



**ABBILDUNG 17-2** Schematische Darstellung eines Antigens. Das Symbol R bezeichnet eine einzige Determinante immunologischer Spezifität und ist diejenige Gruppe, die sich mit einem Antikörpermolekül verbindet.

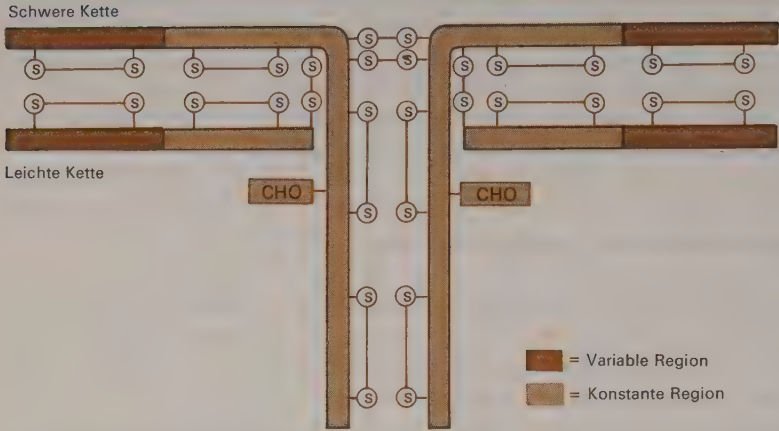
sehr groß, möglicherweise größer als 10.000. Diese Schätzung beruht auf Versuchen, die prüfen, ob Antikörper, die durch ein bestimmtes Protein induziert wurden, je zufällig mit einem völlig unverwandten Protein reagieren. Höchst überraschenderweise kommt es fast nie zu Kreuzreaktionen. Wenn es nur ca. 1000 verschiedene Antikörper gäbe, sollte man inzwischen zahlreiche Beispiele für Kreuzreaktionen gefunden haben.

## ANTI-KÖRPER SIND IMMER PROTEINE

Alle Antikörper sind Proteine. Die selektive Synthese eines spezifischen Antikörpers stellt daher die selektive Synthese eines spezifischen Proteinmoleküls dar, das häufig Immunglobulin genannt wird. Innerhalb einer bestimmten Spezies gibt es Antikörper verschiedener Größen, von denen die wichtigsten  $\gamma G$  ( $MG \sim 150.000$ ),  $\gamma A$  ( $MG \sim 180.000-500.000$ ) und  $\gamma M$  ( $MG \sim 950.000$ ) sind. Jeder Antikörper besteht aus regelmäßigen Aggregaten zweier Größenklassen von Polypeptidketten, die im allgemeinen als leichte und schwere Ketten bezeichnet werden. Die leichteren Ketten der wichtigsten Klassen ( $\gamma G$ ,  $\gamma A$  und  $\gamma M$ ) haben die gleiche Größe und es ist die Beschaffenheit der schweren Kette, die die verschiedenen Klassen voneinander unterscheidet. Die vorherrschende Antikörperklasse bei Säugetieren ist  $\gamma G$ , der wichtigste Antikörper im Serum. Die Mengen von  $\gamma A$  und  $\gamma M$  machen im allgemeinen nur ein Zehntel von  $\gamma G$  aus. Die verschiedenen biologischen Aufgaben der drei verschiedenen Klassen sind noch nicht ganz klar; das erste Stadium einer spezifischen Antikörperreaktion umfaßt aber gewöhnlich  $\gamma M$ -Moleküle. Die  $\gamma G$ -Klasse ist bei weitem am besten charakterisiert und wir werden uns in den folgenden Abschnitten auf sie beschränken.

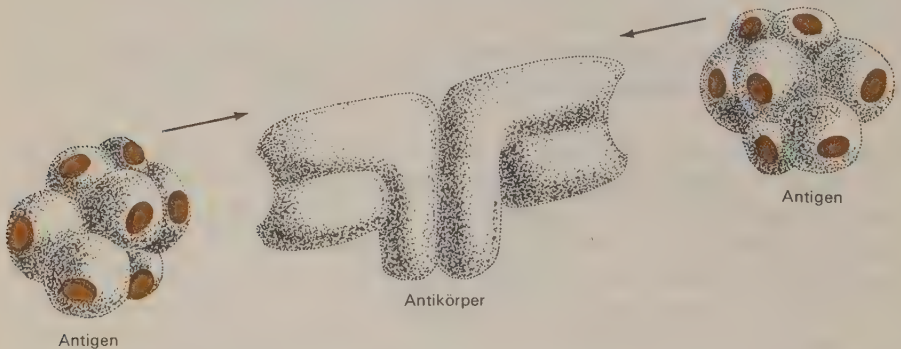
## AUFBAU DES $\gamma G$ -ANTI-KÖRPERMOLEKÜLE AUS ZWEI LEICHTEN UND ZWEI SCHWEREN KETTEN

Gammaglobulin ( $\gamma G$ )-Antikörper sedimentieren in der Ultrazentrifuge bei 7S (Svedberg-Einheiten) und haben Molekulargewichte von ca. 150.000. Jedes Molekül enthält 4 Polypeptidketten in jeweils zwei Paaren: zwei schwere Ketten ( $MG \sim 53.000$ ) und zwei leichte Ketten ( $MG \sim 22.500$ ). In einem gegebenen Molekül sind jeweils sowohl die zwei schweren Ketten wie die zwei leichten Ketten identisch. Jede leichte Kette ist über eine kovalente S-S-Brücke an die schwere Kette gebunden; zwei S-S-Brücken verknüpfen die beiden schweren Ketten; (siehe schematische Darstellung in Abbildung 17-3). Es ist sehr wahrscheinlich, daß verschiedene schwache Wechselwirkungskräfte die vier Ketten zusätzlich zusammenhalten.



**ABBILDUNG 17-3** Modell der Struktur eines menschlichen  $\gamma$ G-Antikörpermoleküls. Die Inter- und Intraketten-Disulfidbrücken sind angezeichnet; CHO bezeichnet die ungefähre Position des Kohlenhydratanteils in der schweren Kette.

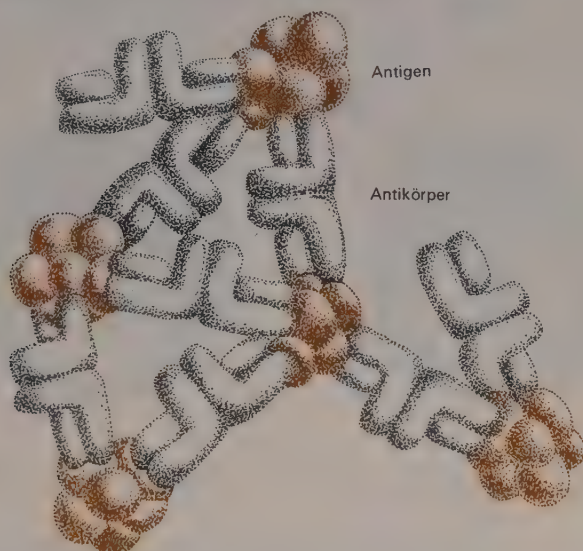
Die Ketten sind so angeordnet, daß jedes Antikörpermolekül zwei identische, weit voneinander entfernte Bereiche enthält, von denen jeder sich mit Antigen verbinden kann, wobei die komplementären Oberflächen durch sekundäre Wechselwirkungskräfte zusammengehalten werden (Abbildung 17-4). Im Elektronenmikroskop sieht man die aktiven Bereiche am Ende länglicher Moleküle von ca. 150 Å Länge. Die genauen molekularen Details dieser aktiven Bereiche werden wir jedoch erst wissen, wenn die dreidimensionale Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt sein wird.



**ABBILDUNG 17-4** Vorliegen zweier identischer Antigen-Bindungsstellen auf jedem  $\gamma$ -S-Antikörpermolekül. Atome sowohl der leichten als der schweren Kette werden für die Bildung der Bindungsstellen verwendet.



Das Vorhandensein zweier identischer Bindungsstellen gestattet einem einzigen Antikörpermolekül zwei ähnliche Antigene zu verknüpfen; diese Fähigkeit ist von großem Vorteil für die Bekämpfung einer Infektion mit Mikroorganismen durch Antikörper. Der Grund dafür liegt darin, daß alle Mikroorganismen eine große Zahl identischer Determinanten besitzen. In Gegenwart spezifischer Antikörper wird ein Mikroorganismus daher über Antikörperbrücken an eine große Zahl ähnlicher Mikroorganismen gebunden (Abbildung 17-5). Diese Aggregate werden dann leichter durch phagozytierende weiße Blutzellen aufgenommen und zerstört.

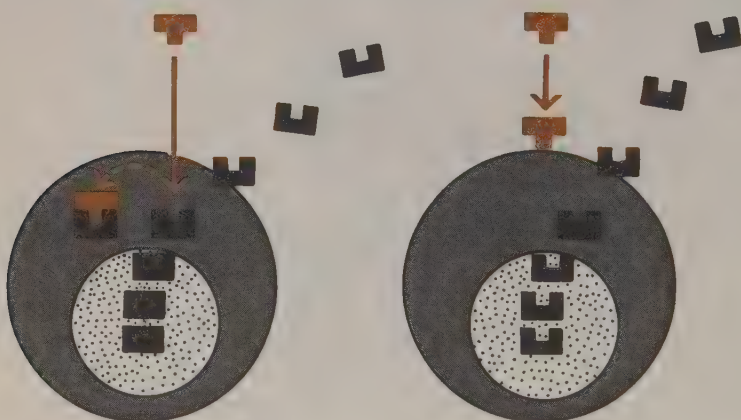


**ABBILDUNG 17-5** Schematische Darstellung der Verbindung zwischen Antigenen und Antikörpern zu großen Aggregaten.

### DIE SPEZIFITÄT DER ANTIKÖRPER BERUHT AUF DER AMINOSÄURESEQUENZ

Bis vor kurzem gab es zwei widersprüchliche Hypothesen, um zu erklären, was ein  $\gamma$ G-Antikörpermolekül von einem anderen unterscheidet. Eine Theorie ging davon aus, daß die grobe Molekülstruktur aller  $\gamma$ G-Antikörper ähnlich ist. Diese Ähnlichkeit veranlaßte manche Leute zu glauben, daß die Aminosäuresequenzen aller Antikörpermoleküle die gleichen wären, und zu postulieren, daß der wesentliche Unterschied zwischen verschiedenen Antikörpern in der genauen dreidimensionalen Struktur läge: in der Faltung der identischen Ketten. Falls das so wäre, würde das Antigen bestimmen, welcher Antikörper gebildet werden soll, indem es sich mit einer neu syntheti-

sierten Antikörperkette vor ihrer Faltung zur endgültigen dreidimensionalen Form verbindet. Die Wechselwirkung würde es einem Teil des Antikörpermoleküls ermöglichen, sich um das Antigen zu falten, wodurch automatisch die komplementäre Gestalt zwischen den beiden Molekülen hergestellt würde. Da nach diesem Schema und seinen meisten Varianten das Antigen unmittelbar die Gestalt des Antikörpers bestimmt, werden solche Modelle als «Instruktionstheorien» der Antikörperbildung bezeichnet (Abbildung 17-6).



**ABBILDUNG 17-6** Schematischer Vergleich zwischen Instruktionstheorien und Selektionstheorien der Antikörperbildung. Nach der Instruktionstheorie dringt ein Antigen in eine Plasmazelle ein und bildet eine Matrice, um die der komplementäre Antikörper gefaltet wird. Selektionstheorien besagen, daß bloßer Kontakt eines bestimmten Antigens mit einer potentiell Antikörper-produzierenden Zelle ein Signal an den Zellkern gibt, mRNA-Ketten zu synthetisieren, die für einen komplementären Antikörper spezifisch sind (Nachzeichnung nach G. J. V. Nossal, Sci. Am., Dezember 1964, S. 112, mit Genehmigung).

Die Instruktionstheorien sind heute jedoch ins Hintertreffen geraten. Statt dessen glauben praktisch alle, daß es nicht nur Unterschiede in der dreidimensionalen Struktur, sondern auch solche in der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) verschiedener Antikörper gibt. Einer der überzeugendsten Beweise dafür stammt aus Versuchen, in welchen die dreidimensionale Struktur vorübergehend zerstört (denaturiert) wird; man läßt sie sich dann in Abwesenheit von Antigen zurückbilden und die Antikörper gewinnen ihre Spezifität wieder. Zusätzlich gibt es eine steigende Zahl direkter chemischer Befunde, die auf der Aminosäuresequenz gereinigter Antikörper beruhen. Es gibt hierbei eindeutige Unterschiede und es hat sich gezeigt, daß Anti-

körper aus zwei distinkten Bereichen bestehen: einer ist allen Antikörpern gemein, was den Eindruck erklärt, daß alle Antikörper chemisch sehr ähnlich sind. Die Aminosäuresequenz im anderen Bereich, und damit die dreidimensionale Struktur, ist von Antikörper zu Antikörper verschieden.

Das Vorhandensein verschiedener Aminosäuresequenzen für jeden spezifischen Antikörper führt unmittelbar zu der Frage, ob es für jeden Antikörper ein bestimmtes Gen gibt. Da ein gegebenes, Antikörper-produzierendes Tier eine sehr große Zahl von Antikörpern synthetisieren kann, wäre es möglich, daß eine sehr große Zahl von Genen die Aminosäuresequenzen der Antikörper codiert. Viele Jahre hindurch widerstrebte diese Möglichkeit vielen Immunologen, die sich der großen Zahl verschiedener antigener Determinanten bewußt waren. Heute kann man dieser Schwierigkeit jedoch nicht mehr aus dem Weg gehen. Da die Aminosäuresequenzen verschieden sind, müssen auch entsprechende Unterschiede in den mRNA-Matrizen und damit in den betreffenden DNA-Regionen vorhanden sein.

Wir sind zusätzlich mit dem Problem konfrontiert, daß es im Fall des Vorhandenseins verschiedener Gene auch Kontrollmechanismen geben muß, durch welche die Anwesenheit eines Antigens dem Gen für den entsprechenden Antikörper befiehlt, in Aktion zu treten. Auf irgendeine Weise muß die Anwesenheit eines Antigens die selektive Synthese ganz bestimmter Aminosäuresequenzen verursachen (Selektionstheorie der Antikörperbildung).

## MYELOMPROTEINE ALS MODELLE FÜR INDIVIDUELLE ANTIKÖRPER

Zu jedem Zeitpunkt stellen die Antikörper im Serum eines Individuums eine Ansammlung sehr vieler verschiedener Antikörpermoleküle dar, die gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene gerichtet sind. Sogar nach anhaltender Immunisierung mit einem einzigen starken Antigen ist keine einzige Antikörperspezies in einer für ihre Isolierung ausreichend reinen Form vorhanden. Es verbleiben nicht nur Spuren der vielen anderen Antikörper, die bereits früher im Leben des Individuums induziert wurden; noch wichtiger ist, daß ein gegebenes einzelnes Antigen immer die Synthese mehrerer verschiedener Antikörper hervorzurufen scheint, von denen jeder eine andere Aminosäuresequenz aufweist, die sich aber alle mit demselben Antigen verbinden können.

Einzelne Antikörperspezies können jedoch aus dem Blut bestimmter Individuen isoliert werden, die an einer Knochenmarkerkrankung, dem multiplen Myelom, leiden. Bei dieser Krankheit, einer Krebsart, kommt es zur unkontrollierten Vermehrung Antikörper-produzierender Zellen. Es ist von größter Bedeutung, daß ein bestimmter spezifischer Tumor nur einen Antikörper-

Typ liefert, der durch eine spezifische Aminosäuresequenz charakterisiert ist. Die Antikörper, die von verschiedenen Myelomtumoren produziert werden, haben außerdem jeweils verschiedene Aminosäuresequenzen, was vergleichende Untersuchungen an vielen verschiedenen Antikörpersequenzen erlaubte. Bis jetzt hat noch niemand ein Antigen mit hoher Affinität für eines der Myelomproteine gefunden. Nach Untersuchung ausreichender Anzahlen wird das jedoch zu erwarten sein. Nach allen bisherigen Untersuchungen haben Myelomproteine identische Eigenschaften, die mit denen wohl definierte Antikörpern identisch sind.

Die Menge eines bestimmten Myelomproteins, die in einem Patienten gemacht wird, ist so groß, daß die Aminosäuresequenzanalyse leicht möglich ist. Außerdem gibt es in einer Reihe von Versuchstieren ähnliche Tumoren. Besonders Mäuse liefern ein ausgezeichnetes System für die Arbeit mit Myelomproteinen, da sie die Möglichkeit ausführlicher genetischer Analysen bieten.

### **BENCE-JONES PROTEINE SIND SPEZIFISCHE LEICHTE KETTEN**

Viele Myelompatienten scheiden in ihrem Urin große Mengen spezifischer Proteine aus, die nach ihrem Entdecker, einem englischen Arzt des 19. Jahrhunderts benannt wurden. Sie wurden ursprünglich deshalb gefunden, weil sie, im Gegensatz zu den meisten Proteinen, bei Siedetemperaturen nicht ausfallen. Wir wissen heute, daß ein gegebenes Bence-Jones Protein mit der leichten Kette des entsprechenden Myelomantikörpers identisch ist. Seine Ausscheidung im Urin ist das Ergebnis der Überproduktion leichter Ketten des Antikörpers durch die Myelomzelle. Die biologischen Kontrollmechanismen, die normalerweise eine ausgewogene Produktion von schweren und leichten Ketten garantieren, sind irgendwie verloren gegangen und es kommt daher zur überschüssigen Synthese leichter Ketten. Das Vorkommen großer Mengen von Bence-Jones Proteinen, zusammen mit ihrem ungewöhnlichen Löslichkeitsverhalten, erleichtert ihre Isolierung sehr und die ersten wichtigen Erkenntnisse über die Aminosäuresequenzen von Antikörpern stammten von Untersuchungen dieser Proteine.

### **LEICHTE UND SCHWERE KETTEN BESTEHEN AUS KONSTANTEN UND VARIABLEN BEREICHEN**

Die Aufklärung der Aminosäuresequenzen der ersten isolierten leichten Ketten zeigte eine variable aminoterminal Sequenz (Aminosäurereste 1 bis ca. 108), die für jeden Antikörpertyp spezifisch ist, verknüpft mit einer konstanten carboxyterminalen Region (Aminosäurereste 109 bis 214), die

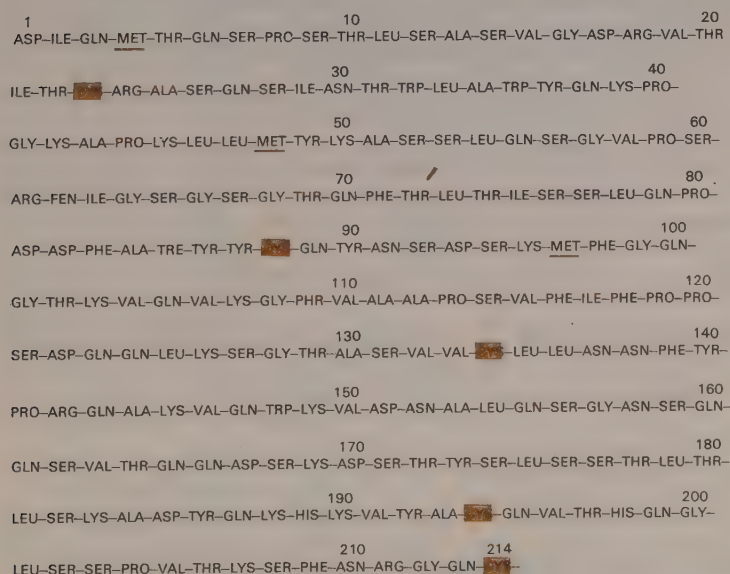


alle Antikörper gemeinsam haben. Als kürzlich die ersten Daten über schwere Ketten bekannt wurden, zeichnete sich dasselbe Bild ab: Variabilität am aminoterminalen Ende und Konstanz am Carboxylende. Die konstante Region der schweren Kette ist verhältnismäßig viel größer, d.h. dreimal länger (~330 Aminosäuren), als die variable Region der schweren Kette (~110 Aminosäuren). Die Länge der variablen Regionen der leichten und der schweren Ketten ist daher ungefähr gleich groß.












Abbildung 17-7 zeigt die Sequenz der leichten Kette, Abbildung 17-8 die der schweren Kette von EU, des ersten Antikörpers, dessen gesamte zweidimensionale Struktur ausgearbeitet wurde. Insgesamt wurden 660 Aminosäurereste eingeordnet, was eine sehr große Leistung bedeutet: EU ist bisher das größte Protein, dessen Sequenz vollständig aufgeklärt wurde.

#### URSPRUNG DER SCHWEREN KETTE DURCH WIEDERHOLTE DUPLIKATION EINES PRIMITIVEN ANTIKÖRPERGENS

Eine Analyse der obengenannten Sequenzen weist stark darauf hin, daß die schwere Kette sich durch aufeinanderfolgende Duplikation eines primitiven Antikörpergens entwickelt hat. Um das zu illustrieren, ist die Sequenz

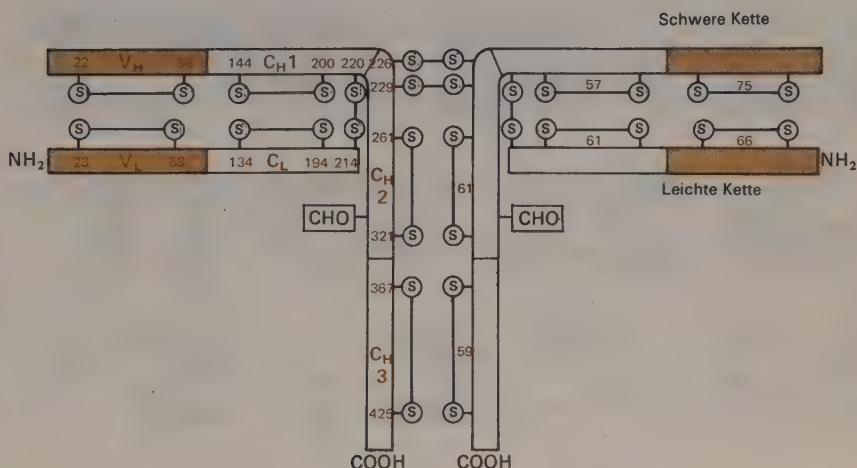


**ABBILDUNG 17-7** Die Aminosäuresequenz der leichten Kette des menschlichen Immunglobulins EU.

1 PCA-VAL-GLN-LEU-VAL-GLN-SER-GLY-ALA-GLN-VAL-LYS-LYS-PRO-GLY-SER-SER-VAL-LYS-VAL- 20  
 30 SER--LYS-ALA-SER-GLY-GLY-THR-PHE-SER-ARG-SER-ALA-ILE-ELE-TRP-VAL-ARG-GLN-ALA- 40  
 50 PRO-GLY-GLN-GLY-LEU-GLN-TRP-MET-GLY-GLY-ILE-VAL-PRO-MET-PHE-GLY-PRO-PRO-ASN-TYR- 60  
 70 ALA-GLN-LYS-PHE-GLN-GLY-ARG-VAL-THR-ILE-THR-ALA-ASP-GLN-SER-THR-ASN-THR-ALA-TYR- 80  
 90 MET-GLN-LEU-SER-SER-LEU-ARG-SER-GLN-ASP-TRY-ALA-PHE-TYR-PHE--ALA-GLY-GLY-TYR- 100  
 110 GLY-ILE-TYR-SER-PRO-GLN-GLN-TYR-ASN-GLY-GLY-LEU-VAL-THR-VAL-SER-SER-ALA-SER-THR- 120  
 130 LYS-GLY-PRO-SER-VAL-PHE-PRO-LEU-ALA-PRO-SER-SER-LYS-SER-THR-SER-GLY-GLY-THR-ALA- 140  
 150 ALA-LEU-GLY--LEU-TAL-LYS-ASP-TYR-PHE-PRO-GLN-PRO-VAL-THR-VAL-SER-TRP-ASN-SER- 160  
 170 GLY-ALA-LEU-THR-SER-GLY-TAL-HIS-THR-PHE-PRO-ALA-VAL-LEU-GLN-SER-SER-GLY-LEU-TYR- 180  
 190 SER-LEU-SER-SER-VAL-VAL-THR-VAL-PRO-SER-SER-SER-LEU-GLY-THR-GLN-THR-TYR-ILE-- 200  
 210 ASN-VAL-ASN-HIS-LYS-PRO-SER-ASN-THR-LYS-VAL-ASP-LYS-ARG-VAL-GLN-PRO-LYS-SER-- 220  
 230 ASP-LYS-THR-HIS-THR--PRO-PRO--PRO-ALA-PRO-GLN-LEU-LEU-GLY-GLY-PRO-SER-VAL- 240  
 250 PHE-LEU-PHE-PRO-PRO-LYS-PRO-LYS-ASP-THR-LEU-MET-ILE-SER-ARG-THR-PRO-GLN-VAL-THR- 260  
 270 -VAL-VAL-VAL-ASP-VAL-SER-HIS-GLN-ASP-PRO-GLN-VAL-LYS-PHE-ASN-TRP-TYR-VAL-ASP- 280  
 290 GLY-VAL-GLN-VAL-HIS-ASN-ALA-LYS-THR-LYS-PRO-ARG-GLN-GLN-TYR-ASX-SER-THR-TYR- 300  
 310 ARG-VAL-VAL-SER-VAL-LEU-TRE-VAL-LEU-HIS-GLU-NH<sub>2</sub>-ASN-TRP-LEU-ASP-GLI-LIS-GLU-TIR-LIS- 320  
 330 -LYS-VAL-SER-ASN-LYS-ALA-LEU-PRO-ALA-PRO-ILE-GLN-LYS-THR-ILE-SER-LYS-ALA-LYS- 340  
 350 GLY-GLN-PRO-ARG-GLN-PRO-GLN-VAL-TYR-THR-LEU-PRO-PRO-SER-ARG-GLN-GLN-MET-TRE-LYS- 360  
 370 ASN-GLN-VAL-SER-LEU-THR--LEU-VAL-LYS-GLY-PHE-TYR-PRO-SER-ASP-ILE-ALA-VAL-GLN- 380  
 390 TRP-GLN-SER-ASN-ASP-GLY-GLN-PRO-GLN-ASN-TYR-LYS-THR-THR-PRO-PRO-VAL-LEU-ASP-SER- 400  
 410 ASP-GLY-SER-PHE-PHE-LEU-TYR-SER-LYS-LEU-THR-VAL-ASP-LYS-SER-ARG-TRP-GLN-GLN-GLY- 420  
 430 ASN-VAL-PHE-SER--SER-VAL-MET-HIS-GLN-ALA-LEU-HIS-ASN-HIS-TYR-THR-GLN-LYS-SER- 440

**ABBILDUNG 17-8** Die Aminosäuresequenz der schweren Kette des menschlichen Immunglobulins EU.

in vier Bereiche unterteilt, wie in Abbildung 17-9 gezeigt wird. Der erste, die variable Region, weist Ähnlichkeiten mit dem variablen Teil der leichten Kette auf. Die drei Regionen des konstanten Teils zeigen ihrerseits starke Homologien, sowohl untereinander als auch zum konstanten Teil der leichten Kette. Diese Beziehungen sind in Abbildung 17-10 leicht zu sehen, wo die Sequenzen von  $C_L$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$  und  $C_H3$  verglichen werden. Über eine Strecke von 100 Aminosäureresten besteht Identität zwischen zwei beliebigen Regionen an ungefähr 30 Positionen. Außerdem gibt es innerhalb jeder Region eine S-S-Brücke, deren zwei Schwefelatome durch 50-60 Aminosäuren getrennt sind. Im Gegensatz dazu gibt es keine S-S-Brücken zwischen Aminosäureresten in verschiedenen Regionen der gleichen Kette. Man kann daraus schließen, daß jede homologe Region als relativ distinkter Bereich vorliegt und nicht eng an andere gepackt ist. Diese Annahme bedarf jedoch künftiger Röntgenstrukturanalysen für einen weiteren Beweis oder Gegenbeweis.



**ABBILDUNG 17-9** Interne Homologien im  $\gamma$ G-Antikörpermolekül. Die variablen Regionen  $V_L$  und  $V_H$  sind zueinander homolog, ebenso wie die konstanten Regionen  $C_L$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$  und  $C_H3$ .

Es ist verlockend, Spekulationen darüber anzustellen, ob die Tatsache, daß innerhalb aller variablen Regionen ebenfalls eine einzige S-S-Brücke vorliegt, bedeutet, daß die konstanten und variablen Teile einen gemeinsamen Vorfahren hatten. Falls das so ist, könnte der erste Schritt in der Evolution der Immunglobuline die Duplikation eines primitiven Gens gewesen sein. Das hätte zu einem kombinierten Gen mit zwei identischen Nukleotidse-

																				120									
EU CL (Aminosäurereste 109 - 214)										THR VAL ALA ALA PRO SER VAL PHE ILE PHE PRO PRO SER																			
EU C <sub>H</sub> 1 (Aminosäurereste 119 - 220)										SER THR LYS GLY PRO SER VAL PHE - - PRO LEU ALA																			
EU C <sub>H</sub> 2 (Aminosäurereste 234 - 341)										LEU LEU GLY GLY PRO SER VAL PHE LEU PHE PRO PRO LYS										ALA									
EU C <sub>H</sub> 3 (Aminosäurereste 342 - 445)										PRO ARG GLN PRO GLN-NH <sub>2</sub> VAL TYR THR LEU PRO PRO SER																			

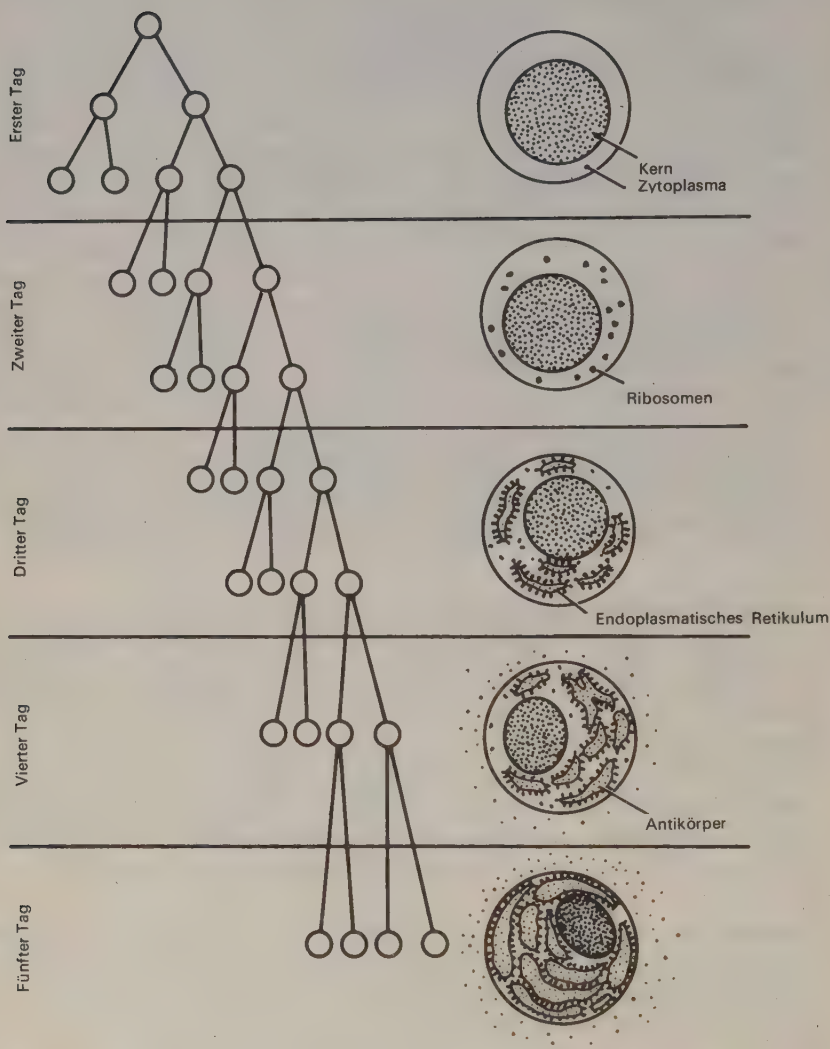


## **SOWOHL LEICHTE ALS AUCH SCHWERE KETTEN BEEINFLUSSEN DIE SPEZIFITÄT VON ANTIKÖRPERN**

Der Bereich eines Antikörpers, der sich mit der antigenen Determinante verbindet, schließt die variablen Teile sowohl der leichten als auch der schweren Kette ein (Abbildung 17-5). Man nahm zuerst an, daß ein großer Teil der Spezifität auf Variationen in der Aminosäuresequenz der schweren Kette zurückzuführen wäre; heute weiß man jedoch, daß in den meisten Fällen die Aminosäuresequenz der leichten Kette ebenfalls beteiligt ist. Die Entdeckung, daß sowohl leichte als auch schwere Ketten spezifische variable Regionen enthalten, könnte die Schwierigkeiten mildern, die oben angedeutet wurden, und die in der großen Zahl von Genen liegen, die für die Codierung verschiedener Antikörper benötigt werden. Da jeder Antikörper durch zwei Gene codiert sein muß (eins für die leichte, das andere für die schwere Kette), könnte die Zahl der möglichen Antikörper sich aus der Zahl der verschiedenen leichten Ketten, multipliziert mit der Zahl der verschiedenen schweren Ketten, ergeben. Eine Million verschiedener Antikörper könnte daher durch nur zweitausend Gene gebildet werden, die tausend verschiedene leichte Ketten und tausend verschiedene schwere Ketten codieren.

## **PLASMAZELLEN SIND DER ORT DER ANTIKÖRPERSYNTHESE**

Es ist offensichtlich, daß wir wissen müssen, welche Zelltypen Antikörper produzieren, bevor wir die Selektionstheorie der Antikörperbildung ernstlich überprüfen können. Man weiß seit langem, daß die Milz und die Lymphknoten Orte der Antikörpersynthese sind. Zuerst nahm man an, daß eine phagozytierende weiße Blutzelle, der Makrophage, Antikörper produziert. Heute ist jedoch klar, daß eine andere Art weißer Blutzellen, die Plasmazelle, die hauptsächliche oder vielleicht einzige Produktionsstätte von Antikörpern ist. Wenn ein Antigen in ein Tier injiziert wird, treten innerhalb mehrerer Tage erhöhte Zahlen unreifer Plasmazellen auf, die sogenannten Plasmablasten. Diese neuen Zellen entstehen durch Teilung aus einer noch nicht entdeckten Vorläuferzelle (vielleicht einem kleinen Lymphozyten) als Folge der Injektion des Antigens. Jeder Plasmablast existiert als solcher nur für kurze Zeit, bevor er sich zu neuen Tochterzellen teilt. Die Tochterzellen sind jedoch morphologisch mit den Elternzellen nicht identisch. Jeder nachfolgende Teilungszyklus führt zu Zellen mit einem deutlicher ausgeprägten Zytoplasma, das mit zunehmenden Zahlen von Ribosomen gefüllt ist. Am 5. Tag nach Antigeninjektion hat der Zyklus aufeinanderfolgender Zellteilungen zur Produktion reifer Plasmazellen geführt, die dann rasch Antikörpermoleküle produzieren (Abbildung 17-11). Die Injektion eines Antigens in



**ABBILDUNG 17-11** *Aufeinanderfolgende Stadien in der Entwicklung einer reifen Plasmazelle. Mindestens 8 Zellgenerationen und 5-tägiges Wachstum sind notwendig, bevor Zellen auftreten, die eine große Menge von Antikörpern produzieren. Die bemerkenswerteste Eigenheit der reifen Zellen ist das ausgeprägte endoplasmatische Retikulum, dessen innere Höhlungen mit Antikörpermolekülen gefüllt sind (Zeichnung nach G. J. V. Nossal, Sci. Am., Dez. 1964, S. 109, mit Genehmigung).*

den Blustrom hat also zwei separate Effekte. Einer besteht in der Transformation von ruhenden, ribosomenarmen Plasmazellvorläufern zu ribosomenreichen Plasmazellen, die zur raschen Proteinsynthese fähig sind (Abbildung 17-12). Diese Entwicklung ist für die Synthese aller Arten von Antikörpern gemein. Der zweite Effekt des Antigens ist wahrscheinlich wesentlich spezifischer; er besteht wahrscheinlich in der Produktion spezifischer Messenger-RNA-Moleküle, die die einmalige Aminosäuresequenz der spezifischen Antikörpermoleküle codieren.

### EINE GEGEBENE PLASMAZELLE SYNTHETISIERT GEWÖHNLICH NUR ANTIKÖRPERMOLEKÜLE EINES TYPUS

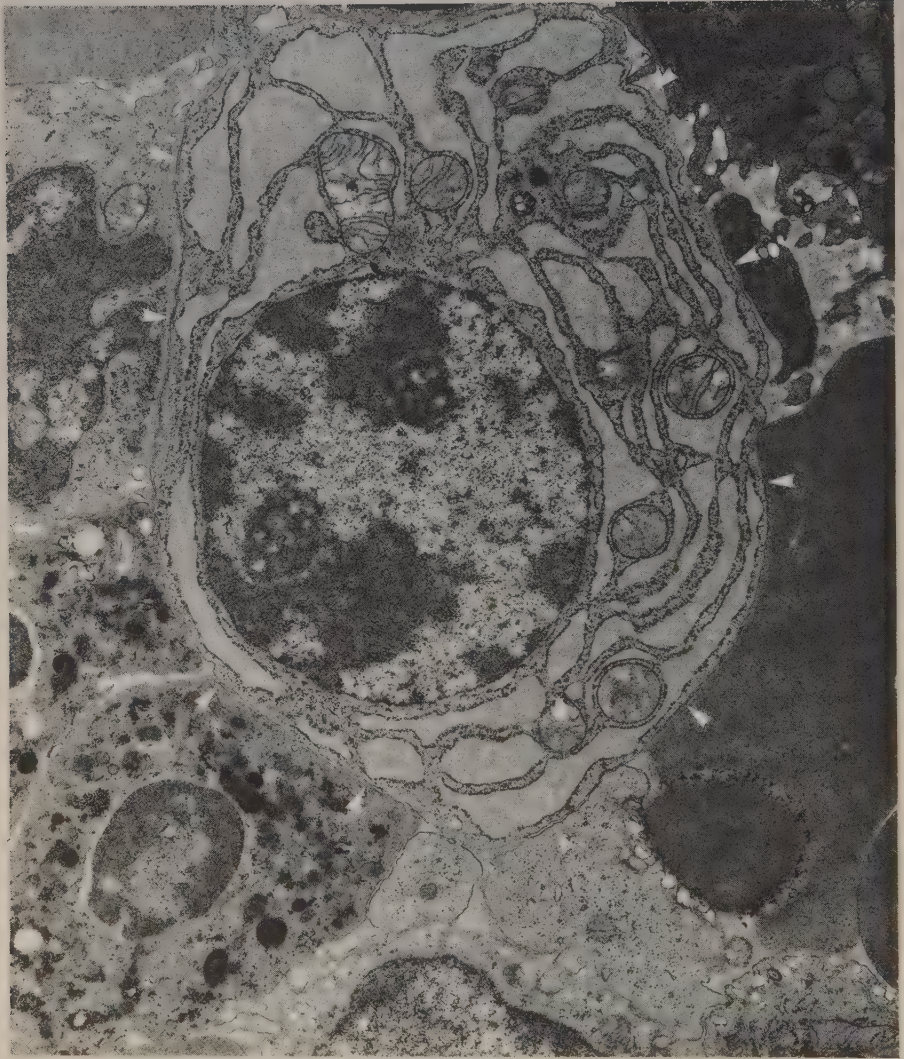
Wenn eine Zahl verschiedener Antigene gleichzeitig in ein Tier injiziert wird, erhebt sich natürlich die Frage, ob eine bestimmte Plasmazelle Antikörper gegen all die fremden Antigene produziert oder ob sie nur einen Antikörpertyp synthetisiert. Nach den Instruktionstheorien würde man erwarten, daß viele verschiedene Antigene in eine einzige Plasmazelle eindringen; jede Zelle sollte demnach viele verschiedene Antikörper produzieren. Die Antwort aus den entsprechenden Versuchen scheint jedoch das Gegenteil zu besagen. Wenn man die Antikörper, die in einer einzigen Zelle synthetisiert wurden, untersucht - was man durch Isolierung einzelner Plasmazellen nach Beginn der Antikörpersynthese tun kann - findet man, daß die meisten Zellen nur Antikörper einer Spezifität synthetisieren. Fast jede Antikörper-bildende Plasmazelle stellt daher eine hoch spezialisierte Fabrik dar, in der ein großer Teil der Proteinsynthese-der Produktion nur eines Produkts gewidmet ist.

### DIE ZWEITE INJEKTION VON ANTIGEN FÜHRT ZU EINER GESTEIGERTEN ZAHL ANTIKÖRPER-PRODUZIERENDER ZELLEN

Mehrere Tage nach einmaliger Antigeninjektion ist die Zahl der Plasmazellen, die die entsprechenden Antikörper synthetisieren, relativ klein. Aus noch unbekannten Gründen wird nur ein kleiner Anteil der Plasmablasten-Vorläufer in Antikörper-produzierende Plasmazellen umgewandelt. Wenn jedoch die erste Injektion einige Wochen später von einer zweiten Injektion gefolgt wird, findet man eine weit größere Zahl Antikörper-produzierender Plasmazellen. Dementsprechend werden sehr viel mehr Antikörpermoleküle gemacht und freigesetzt. Das ist der Grund, weshalb eine Immunisierung meist durch wiederholte Injektionen des gleichen Antigens vorgenommen wird.

Die obigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine erste Antigeninjektion eventuell einige *unspezifische Vorläuferzellen* in *transformierte Vorläufer-*





**ABBILDUNG 17-12** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Plasmazelle aus einer Meerschweinchenmilz (mit freundlicher Erlaubnis von K. R. Porter, Biological Laboratories, Harvard). Die Begrenzung der Zelle ist durch weiße Pfeile angedeutet. Die Höhlungen des endoplasmatischen Retikulums sind durch die Anwesenheit großer Mengen von Antikörpern stark ausgedehnt. Ribosomen sind als schwarze, an das endoplasmatische Retikulum angeheftete Punkte sichtbar. Die Objekte am Rand sind andere Arten weißer Blutzellen.



*zellen* umwandeln könnte, die sich unter dem Einfluß eines zweiten Kontakts mit dem gleichen Antigen vermehren und zu Plasmazellen mit dem entsprechenden Antikörper führen. Einige ruhende Plasmablasten könnten daher ein immunologisches Gedächtnis besitzen. Auf irgendeine Weise scheinen sie genau zu wissen, daß sie bereits früher Kontakt mit einem spezifischen Antigen hatten.

## ANTIKÖRPER-PRODUZIERENDE ZELLEN BRAUCHEN KEIN ANTIGEN ZU ENTHALTEN

Wir könnten annehmen, daß sowohl das immunologische Gedächtnis als auch die Produktion spezifischer Antikörper auf dem Kontakt mit spezifischen Antigenmolekülen beruhen. Es gibt jedoch heute gute Befunde, daß sehr wenig oder gar kein spezifisches Antigen in einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle enthalten ist. Diese Hinweise stammen von Versuchen, in welchen hoch radioaktiv markiertes Antigen in ein Tier injiziert wurde. Einige Tage später werden dünne Schnitte der Antikörper-produzierenden Region durch Autoradiographie untersucht, um herauszufinden, wo das Antigen verblieben ist. Ein großer Teil des markierten Antigens wird in phagozytierenden Makrophagen gefunden, die nicht direkt an der Antikörpersynthese beteiligt sind. Im Gegensatz dazu scheinen die meisten Plasmazellen nicht einmal ein einziges Antigenmolekül zu enthalten; nur wenige Antigenmoleküle sind in den Plasmablasten zu erkennen. Falls diese Beobachtung bestätigt wird, schließt sie unabhängig jede Instruktionstheorie aus. Jede Antikörper-produzierende Zelle macht gleichzeitig tausende Antikörper. Unter Annahme des Instruktionsmodells würde man erwarten, daß tausende Antigenmoleküle in jeder Zelle gefunden werden, vielleicht gebunden an die ribosomalen Orte der Proteinsynthese. Diese Beobachtung unterstützt daher stark die Vorstellung, daß Antigen direkt oder indirekt die Synthese eines spezifischen mRNA-Moleküle *selektioniert*.

Es bleibt jedoch unklar, ob Antigen anwesend sein muß, um die massive Synthese von mRNA-Matrizen zu garantieren. Die Tatsache, daß die Vorläufer-Plasmablasten nur wenige Antigenmoleküle enthalten, weist darauf hin, daß Antigen nicht anwesend sein muß; die Frage ist jedoch noch immer offen. Wenn kein Antigen anwesend ist, muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß der genetische Apparat selbst verändert wurde.

## KLON-SELEKTIONSTHEORIE

Die Tatsache, daß die Anwesenheit von Antigen zu einem Anwachsen der Zahl von Zellen führt, die die entsprechenden spezifischen Antikörper synthetisieren, ließ manche Immunologen vermuten, daß die einzige Aufgabe des

Antigens die Stimulation der Teilung spezifischer Zellen sei. Die Klon-Selektionstheorie (ein Klon ist eine Gruppe identischer Zellen, die alle von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen) geht davon aus, daß ein Antigen keine andere Information liefern muß als die, daß es anwesend ist. Diese Theorie nimmt an, daß vor dem Auftauchen eines Antigens, bereits eine große Zahl verschiedener Plasmazellvorläufer existiert, jede Klasse mit der Eigenschaft ausgestattet, nur eine (oder manchmal zwei) spezifische Art von Antikörpern zu synthetisieren. Das Antigen wirkt dann, indem es die geeignete Klasse auswählt und sie zu selektiver Teilung anregt. Einige der frisch geteilten Vorläuferzellen führen nach mehreren Zellgenerationen zu reifen Plasmazellen. Andere teilen sich vielleicht weiter ohne Antikörper zu produzieren. Diese würden die Zellen sein, die für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind.

Diese Spekulationen führen uns zum obengenannten Problem zurück, ob es ein separates Gen für jede der verschiedenen leichten und schweren Antikörperketten gibt. Die Gesamtpopulation der Plasmazellen eines einzigen Tieres muß sicherlich eine große Zahl verschiedener Gene für Antikörper enthalten. Diese Tatsache hilft uns aber nicht zur Klärung des eigentlichen Problems, ob jede Plasmazelle alle Gene enthält. Man kann tatsächlich die Hypothesen über die Zahl der Gene, die Antikörper codieren, in zwei Hauptgruppen einteilen. Die eine Gruppe betont die obengenannte Möglichkeit, daß jeder haploide Chromosomensatz eine große Anzahl von Antikörper-Genen enthält. In diesem Fall müßte eine bestimmte Plasmazelle (zufällig?) auf die Produktion nur einer Art von Antikörpern beschränkt werden. Es ist ganz und gar nicht offensichtlich, wie das passieren sollte.

Die andere Gruppe nimmt an, daß jeder haploide Chromosomensatz des befruchteten Eies nur ein oder höchstens einige wenige Gene für leichte und schwere Ketten enthält. Nach diesen Hypothesen werden die Antikörper-Gene während der vielen Zellteilungen nach der Befruchtung zufällig verändert und geben so eine große Zahl verschiedener Antikörper-Gene; jedes einzelne ist nur in einer sehr kleinen Zahl der Gesamtpopulation von Plasmazellvorläufern vertreten. Diese Zellen werden dann, wenn sie mit dem entsprechenden Antigen in Kontakt kommen, zur Teilung und zur Produktion ihrer spezifischen Antikörper angeregt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie aus einer kleinen Zahl von Antikörper-Genen eine große Varietät verschiedener Antikörper-Gene entstehen könnte. Eine der vorgeschlagenen Möglichkeiten ist die, daß die Gene für die leichten und schweren Ketten wesentlich größere Mutationshäufigkeiten aufweisen als andere Gene. Das ist allerdings schwer vorzustellen; nicht nur, weil andere Gene nicht mutiert werden dürfen, sondern auch weil die hohe Mutabilität sich auf ungefähr die Hälfte des «leichten» Gens und ein Viertel des «schweren» Gens beschränken müßte, sonst würde

man nicht finden, daß alle leichten (schweren) Ketten identische Aminosäuresequenzen im Bereich des Carboxylendes aufweisen. Eine andere Möglichkeit, zu einer großen Zahl verschiedener Gene zu kommen wäre die, daß jede Zelle mehrere verschiedene Gene für leichte und schwere Ketten enthält. Jedes dieser Gene hätte identische Aminosäuresequenzen an einem Ende (dem  $\text{COO}^-$ -Ende) und recht verschiedene Sequenzen am anderen Ende (dem  $\text{NH}_3^+$ -Ende). Crossing-over (mitotische Rekombination) zwischen diesen verwandten Genen würde dann zu neuen Nukleotidsequenzen führen, von denen jede eine neue Aminosäuresequenz codieren würde. Es gibt im Augenblick keinen eindeutigen Weg, um zwischen Rekombinations- und Mutationshypothesen zu entscheiden. Die Aufklärung der Aminosäuresequenzen mehrerer verschiedener Antikörper könnte jedoch Regelmäßigkeiten in der Aminosäuresequenz ergeben, die dann eher für die Rekombinationsmodelle sprechen würden als für solche, die auf zufälliger Mutation beruhen.

## IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ

Bis jetzt haben wir es vermieden, eine sehr wichtige Eigenschaft der Immunreaktion zu erwähnen. Wie weiß ein Antikörper-bildendes System, daß eine Moleküloberfläche einem *fremden* Molekül angehört? Wie kann es vermeiden, Antikörper gegen seine eigenen Proteine und Nukleinsäuren zu machen? Die fehlende Reaktivität hat nichts mit einem angeborenen Fehlen der Antigenität dieser Moleküle zu tun. Zum Beispiel rufen fast alle menschlichen Proteine in einem Kaninchen die Bildung spezifischer Antikörper hervor. Ebenso sind Kaninchenproteine für den Menschen antigen. Diese Tatsachen führen zu dem Schluß, daß das immunologische System lernt, seine eigenen Moleküle zu erkennen. Dieser Lernprozeß erfolgt sehr früh im Leben, vor der Entwicklung einer aktiven Immunreaktion auf fremde Proteine. Wenn ein fremdes Antigen in ein neugeborenes Tier injiziert wird, bevor dieses über ein Antikörper-bildendes System verfügt, ist das Tier in seinem erwachsenen Leben nicht in der Lage, Antikörper gegen dieses bestimmte Antigen zu bilden. Das fremde Antigen wird als ein Wirtsprotein angesehen. Dieses Ausbleiben einer immunologischen Reaktion auf all die Antigene, die während der Entwicklung des Antikörper-bildenden Systems anwesend waren, wird *immunologische Toleranz* genannt.

Es wäre in der Tat überraschend, wenn die scheinbar gegensätzlichen Phänomene der spezifischen Toleranz und der spezifischen Antikörperreaktion wirklich nichts miteinander zu tun hätten. Eine der Hypothesen, die die beiden Reaktionsarten verbindet, beruht auf der Tatsache, daß eine Zelle, die große Mengen von Antikörpern produziert, sich meistens nicht mehr teilen kann und daher nur noch wenige Tage lebt. Wenn die Klon-Selek-



tionstheorie stimmt, könnte es vielleicht sehr früh im Leben wenige Zellen geben, die genetisch kompetent sind, Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu machen. Immunologische Toleranz würde dann eintreten, wenn die Anwesenheit eines Antigens zu diesem frühen Zeitpunkt statt zu einer bedeutenden Antikörpersynthese zum sofortigen Tod der Zelle führte.

## INDUKTION VON ANTIKÖRPERN IN VITRO

Sogar die ganz begeisterten Immunologen sind sich darüber im klaren, daß man auf zellulärem oder molekularem Niveau nicht versteht, wie die Bildung spezifischer Antikörper oder die Entwicklung der immunologischen Toleranz als Folge einer spezifischen Antigeninjektion zustande kommt. Das führt unmittelbar zur Frage: Warum untersucht man denn nicht die Induktion von Antikörpern an isolierten Zellen, außerhalb des intakten Tieres? Dadurch wäre man automatisch in der Lage, nicht nur die Vorläufer der Plasmablasten-Zwischenstufen eindeutig zu identifizieren, man könnte sogar feststellen, ob sie bereits in bezug auf den Antikörper, den sie später produzieren, differenziert sind. Ursprünglich verliefen praktisch alle *in vitro* Versuche so völlig negativ, daß vereinzelte Berichte über positive Ergebnisse mit allgemeiner Skepsis aufgenommen wurden. Während der letzten Jahre erschienen jedoch einige recht überzeugende Berichte über gelungene Sekundärreaktionen und sogar über Primärreaktionen von Zellen, die niemals vorher dem spezifischen Antigen ausgesetzt waren. Man wird jedoch abwarten müssen, ob dieses System auch zur Klärung einiger grundlegender Antworten verwendet werden kann.

Gegenwärtig werden auch viele Anstrengungen gemacht, Antikörper in zellfreien Systemen zu synthetisieren. Der beschränkte Erfolg, der bisher erzielt wurde, war nur unter Verwendung zellfreier Systeme aus Zellen, die bereits Antikörper synthetisieren, möglich. Viele oder alle der bisher beschriebenen «Antikörper-Systeme» betreffen also nur die Fertigstellung teilweise synthetisierter Ketten. Leider ist die zellfreie Proteinsynthese unter Verwendung von Säugetiersystemen bisher sehr viel weniger effizient als die unter Verwendung von vielen Bakteriensystemen. Die Lage sollte sich jedoch bessern, sobald sich mehr Leute dazu entschließen, mit Säugetiersystemen zu arbeiten.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann deshalb ein Immunologe ein molekulares Niveau nur durch das Studium der Antikörper selbst mit einiger Aussicht auf Erfolg erreichen. Unsere Kenntnisse über die detaillierte Struktur von Antikörpern sind noch immer unvollständig; es ist sehr viel mehr Arbeit erforderlich, um die Struktur der Antikörper in gleichem Maß wie Myoglobin oder Hämoglobin zu verstehen. Die Information über die detaillierte Protein-



struktur der Antikörper mag an sich schon sehr interessant sein; trotzdem kann man nicht annehmen, daß sie notwendigerweise eine Antwort auf das Problem geben wird, wie ein Antigen die Synthese eines spezifischen Antikörpers induziert. Wir sehen daraus, daß die Molekularbiologen, die sich auf die Untersuchung der Antikörpersynthese konzentrieren, um dadurch die Zelldifferenzierung zu verstehen, ein Problem wählen, das bei näherer Betrachtung noch komplizierter erscheint als die embryonale Differenzierung von Ferne betrachtet. Trotzdem ist nicht anzunehmen, daß die wirklich grundlegenden embryologischen Probleme bei richtiger Betrachtung leichter zu lösen sein werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Es herrscht ein großes Bedürfnis nach einem «einfachen» System, in dem Zellen irreversibel differenziert werden, sodaß sie auf äußere Zugabe eines spezifischen, gut bekannten Moleküls mit der Produktion eines wohl-definierten Proteins reagieren. Ein System, das man ursprünglich für «einfach» hielt, ist die Synthese spezifischer Antikörper nach Injektion einer spezifischen fremden Substanz. Die Substanzen, die die Synthese spezifischer Antikörper induzieren, nennt man Antigene. Viele Makromoleküle, einschließlich der meisten Proteine, einiger Kohlenhydrate und Nukleinsäuren, sind Antigene. Antikörper inaktivieren Antigene, indem sie sich mit ihnen zu Komplexen verbinden, die von phagozytierenden weißen Blutzellen aufgenommen werden.*

*Ursprünglich glaubte man, daß ein Antigen die Bildung eines spezifischen Antikörpers dadurch induziert, daß es sich vor der Bildung der dreidimensionalen Gestalt mit dem naszierenden Antikörper verbindet. Nach dieser Hypothese würde der Antikörper sich um die Oberfläche des Antigens falten und dadurch einen Bereich bilden, dessen Gestalt der Oberfläche des Antigens komplementär ist (Instruktionstheorien). Heute weiß man jedoch, daß jeder spezifische Antikörper eine einmalige Aminosäuresequenz besitzt, die sich zu einer einmaligen dreidimensionalen Konfiguration faltet. Das Antigen hat daher die Aufgabe, die Synthese einer spezifischen mRNA-Matrize zu bestimmen, die die erwünschte Aminosäuresequenz codiert (Selektionstheorien).*

*Die häufigste Antikörperklasse, die  $\gamma$ G-Klasse, besteht aus Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000. Sie sind aus zwei identischen leichten Ketten ( $MG \sim 22.500$ ) und zwei identischen schweren Ketten ( $MG \sim 53.000$ ) aufgebaut, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten weisen am Aminoende variable Sequenzen auf; das Carboxylende besteht aus konstanten Regionen. Wegen ihrer dimeren Struktur enthalten alle Antikörper zwei aktive Bereiche, die über sekundäre Bindungskräfte Antigen spezifisch binden können. Die meisten oder alle aktiven*

Bereiche werden durch die variablen Teile der leichten und der schweren Kette begrenzt.

Die Antikörper, die in normalem Serum enthalten sind, stellen eine Ansammlung sehr vieler Proteine mit verschiedenen Aminosäuresequenzen dar. Von Myelomtumoren werden jedoch einzelne Antikörperspezies gemacht; die Myelome dienen jetzt als Quelle für praktisch alle Antikörper, die für Aminosäuresequenzanalysen verwendet werden. Einige Myelome produzieren mehr leichte Ketten als schwere. Die überschüssigen leichten Ketten, die im Urin ausgeschieden werden, nennt man Bence-Jones Proteine.

Der Ort der Antikörpersynthese ist die Plasmazelle. Sie ist eine hochdifferenzierte Zelle, die über eine Plasmablasten-Zwischenstufe (aus kleinen Lymphozyten?) entsteht. In Antikörper-produzierenden Zellen ist wenig oder gar kein Antigen vorhanden. Die meisten Plasmazellen machen nur eine Art von Antikörpern. Das deutet an, daß jede Plasmazelle genetisch auf die Produktion nur eines Antikörpertyps (zweier Typen) beschränkt ist. Die Zahl der Plasmazellen, die einen bestimmten Antikörper synthetisieren, steigt bei wiederholten Antigeninjektionen. Man schließt daraus, daß die Anwesenheit eines Antigens die Teilung von Zellen stimuliert; sie können sich dann zu einer Plasmazelle entwickeln, welche den entsprechenden Antikörper produziert (Klon-Selektionstheorie). Diese Theorie postuliert, daß vor Antigeninjektion eine große Zahl verschiedener Zellen vorliegt, die bereits bezüglich des Antikörpers, den die Nachkommenschaft produzieren kann, differenziert ist.

Da Antikörper nur gegen fremde Proteine gebildet werden, muß das immunologische System eines Tieres seine eigenen Proteine erkennen können. Dieser Lernprozeß findet früh im Leben statt, bevor es zirkulierende Antikörper gibt. Wenn ein fremdes Protein in ein neugeborenes Tier injiziert wird, kann das Tier in seinem späteren Leben keine Antikörper gegen das betreffende fremde Protein machen (immunologische Toleranz).

## LITERATUR

- Landsteiner, K., *The Specificity of Serological Reaction*, Rev. Ed., Dover, New York, 1964. Nachdruck eines Klassikers der Wissenschaft, 1943 zuletzt überarbeitet. Noch immer eine ausgezeichnete Einführung in die Immunologie. (Taschenbuch).
- Lederberg, J., «Genes and Antibodies», *Science* **129**, 1649 (1959). Die Probleme der Antikörpersynthese, wie sie ein neugieriger Genetiker 1959 sah.
- Nossal, G. J. V., «How Cells Make Antibodies», *Sci. Am.*, Dezember 1964, S. 106. Eine klare Zusammenfassung der Schwierigkeiten der Immunologie, Ende 1964.
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg und W. B. Wood, *Microbiology*, Harper and Row, New York, 1967. Der Abschnitt über Immunologie (über 250 Seiten) von Herman Eisen übertrifft in jeder Beziehung alle Abhandlungen in anderen Lehrbüchern.

- «Antibodies», *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **32**, (1967). Der vollständigste Überblick über Ideen und Versuche aller Aspekte der Immunologie. Das Schlußwort von Nils Jerne ist ein kleines Meisterwerk.
- «Gamma Globulins Structure and Control of Biosynthesis», J. Kilander (Ed.), *Nobel Symp.* **3**, Wiley (Interscience), New York, 1967. Vorträge nach einer Tagung in Stockholm.
- Smithies, O., «Antibody Variability», *Science* **157**, 267 (1967). Argumente zugunsten der somatischen Rekombination als Grundlage für multiple Sequenzen der Antikörper-Gene, von einem ihrer klügsten Verfechter.
- Edelmann, G. M., B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser und M. Y. Waxdel, «The Covalent Structure of an Entire  $\gamma$ G Immunoglobulin Molecule», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **63**, 78 (1969). Veröffentlichung der ersten vollständigen kovalenten Struktur eines Antikörpers.
- Edelman, G. M., und W. E. Gall, «The Antibody Problem», *Ann. Rev. Biochem.*, **38** (1969). Ein sehr kompletter Artikel mit Betonung der Aminosäuresequenzresultate.
- Burnet, F. M. *Cellular Immunology*, Cambridge University Press, London und New York, 1969, Eine ausführliche und einführende Diskussion aller Aspekte der Immunologie unter Betonung der Klon-Selektionstheorie.

# 18

## DER KREBS AUS DER PERSPEKTIVE DES GENETIKERS

In den vorhergehenden zwei Kapiteln wurde überdeutlich, daß das Problem, die genetische Basis der Zelldifferenzierung auf molekularer Ebene zu verstehen, äußerst schwierig zu lösen sein dürfte. Erst heute beginnen wir, etwas Zuversicht zu gewinnen, daß wir nahe daran sind, die wesentlichen molekularen Charakteristika zu verstehen, auf denen das Leben sogar der einfachsten Bakterienzelle basiert. Der Sprung zum Versuch, die viel kompliziertere Zelle eines Säugetiers mit ihrem tausendmal größeren DNA-Gehalt zu verstehen, hat erst begonnen. Obwohl wir jetzt einige dieser Zellen in Gewebekultur züchten können, ist es uns immer schmerzlich bewußt, daß die normale Umgebung einer Zelle eines multizellulären Organismus ist und daß wir bei der Entfernung einer Zelle aus ihrer normalen zellulären Umgebung sie so verändern könnten, daß sie nicht mehr fähig ist, auf eine Art zu funktionieren, die uns interessiert.

So müsste man annehmen, daß, wenn es schon sehr schwierig ist, sich an die molekulare Basis der normalen Differenzierung heranzuwagen, es noch schwieriger wäre, Fehler in der Zellvererbung zu verstehen, die abnormale Zellen erzeugen, die nicht imstande sind, sich in organisierte multizelluläre Komplexe zu integrieren. Das heißt: wenn wir noch einen ungeheuer langen Weg davon entfernt sind, eine gesunde tierische Zelle auf molekularer Ebene zu verstehen, haben wir irgendeine Chance, Einblick in die kranke Zelle zu gewinnen? Ist es wahrscheinlich, daß wir bald die Mehr-



zahl der Krankheiten auf molekularer Ebene verstehen werden? Zum Glück wissen wir schon, daß zumindest einige Krankheiten so zu verstehen sind. Die abnormalen Hämoglobinemoleküle (vergleiche Kapitel 8), die verschiedene Blutkrankheiten verursachen (Anämien), sind ein Beispiel. Hier sind wir imstande, ihre molekulare Basis zu verstehen (aber noch nicht, sie zu kurieren!), weil wir vorher sehr detaillierte Kenntnis der Struktur des normalen Hämoglobins hatten. *Unsere Chance, eine Krankheit zu verstehen, hängt weitgehend davon ab, ob sie auf Abnormitäten in Molekülen beruht, mit denen wir schon vertraut sind.*

Von diesem Gesichtspunkt aus können wir das Krebsproblem betrachten. Der Ausdruck *Krebs* umfaßt eine Vielzahl verschiedener Krankheiten, die alle durch die Eigenheit charakterisiert sind, daß Zellen wachsen, wenn sie nicht sollten. Wir haben es somit mit dem Problem der *Kontrolle der Zellteilung* zu tun und müssen uns daher fragen, was einer normalen Zelle in einem multizellulären Organismus befiehlt, mit der Teilung aufzuhören. Dies ist ein Problem, das auf bakterieller Ebene nicht existiert, denn Bakterien trennen sich voneinander, bald nachdem die Zellteilung stattgefunden hat. Unsere Studien bakterieller Zellen geben uns daher keine direkten Hinweise. Das Problem muß also direkt auf der Ebene der höheren eukaryotischen Zelle in Angriff genommen werden. Hier tapen wir leider noch immer im Dunkeln, trotz vieler klug ausgedachter Anstrengungen in bezug auf molekulare Faktoren, die dafür sorgen, daß Zellen zur richtigen Zeit aufhören zu wachsen und sich zu teilen. Daher sind viele aufgeschlossene Biochemiker der Ansicht, daß es heute noch nicht an der Zeit ist, ernsthaft an der Biochemie der krebserkrankten Zelle zu arbeiten. Sie argumentieren, daß es, obwohl Krebszellen die Ursache ungeheuren menschlichen Leidens sind, keinen Sinn hat, einen unverhältnismäßig großen Anteil unserer wissenschaftlichen Anstrengungen dafür aufzuwenden, eine intellektuelle Herausforderung anzunehmen, für die die Zeit noch nicht reif ist. Sie vergleichen die gegenwärtige Situation mit dem Wunsch, zur Zeit Newtons die Natur der Sonnenenergie zu verstehen.

Ich habe jedoch den Verdacht, daß dieser Pessimismus nicht gerechtfertigt sein könnte und daß wir bald zu einem gewissen Verständnis zumindest einiger Aspekte des unkontrollierten Zellwachstums auf molekularer Ebene kommen könnten. Dieser Optimismus ergibt sich aus einigen kürzlich erfolgten spektakulären Resultaten bei der Induktion von Tumoren durch Viren. Bevor wir jedoch die Argumente darlegen, sollten wir erst das Problem genauer definieren.

**KREBS KANN IN FAST ALLEN DIFFERENZIIERTEN ZELLEN ENTSTEHEN**

Es gibt viele verschiedene Arten des unkontrollierten Zellwachstums (Krebs). Jede scheint durch eine erbliche Veränderung in einer spezifischen Zelle zu entstehen. Fast alle Arten von differenzierten Zellen können zu Krebszellen (malignen Zellen) transformiert werden. So können Leberzellen, Haut-Nerven-, Nieren-, Blut-, Knochenzellen und so weiter zu Krebszellen werden. Im allgemeinen zeigen Krebszellen viele morphologische und funktionelle Charakteristika, die sie mit den normalen Zellen, aus denen sie entstanden sind, gemeinsam haben. Zum Beispiel produzieren Krebszellen, die in der Schilddrüse entstehen, oft das Hormon Thyroxin, das spezifisch durch normale Schilddrüsenzellen synthetisiert wird.

Zusammenhängende Massen von Krebszellen werden Tumoren genannt. Es bestehen große Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der Tumoren wachsen. Einige wachsen verhältnismäßig langsam, während andere schnell wachsen und ihren Wirt unweigerlich töten, wenn sie nicht durch einen chirurgischen Eingriff oder Bestrahlung entfernt werden. Es bestehen auch große Unterschiede in der Affinität der verschiedenen Arten von Krebszellen für andere Zellen. Einige Krebszellen neigen dazu, an ihrem Entstehungsort zu verbleiben. Die Tumoren, die sie erzeugen, sind oft nicht schädlich, denn sie können für gewöhnlich leicht entfernt werden. Andere verbreiten sich schnell im Organismus und befallen viele verschiedene normale Gewebe. Metastasierende Krebsarten können, nachdem sie sich ausgebreitet haben, im allgemeinen durch einen chirurgischen Eingriff oder eine andere Behandlung nicht vollständig entfernt werden und führen fast immer zum Tod, es sei denn, sie würden bald nach ihrer Entstehung entdeckt.

**KREBSZELLEN WACHSEN, WENN SIE NICHT SOLLTEN**

Wir können eine Krebszelle nicht durch die Tatsache von einer normalen Zelle unterscheiden, daß sich die Tumorzelle ständig teilt und die normale Zelle nur selten. In der Tat entstehen Tumoren meistens in Zellen, die sich normalerweise häufig teilen. In ausgewachsenen Tieren befinden sich viele normale Zellen ständig in einem Wachstums- und Zellteilungsprozeß. Dies trifft besonders für Zellen zu, die der Außenwelt ausgesetzt sind. Zum Beispiel bilden die Epithelzellen der Haut und jene, die die verschiedenen Hohlorgane des Verdauungssystems auskleiden, ständig neue Zellen, um die grosse Zahl von Zellen zu ersetzen, die täglich absterben. Ähnlich haben die verschiedenen Arten von Blutzellen relativ kurze Lebensdauer und müssen durch die Teilung schon existierender Vorläuferzellen ersetzt werden. Andererseits haben solche Organe wie die Leber und das Gehirn Zellen, die

sich im reifen Erwachsenen selten teilen. Zusätzlich zu diesen zwei Arten gibt es andere Zellen, normalerweise im Ruhezustand, die sich nach dem Auftreten eines spezifischen Hormons plötzlich zu teilen beginnen und die Teilung fortsetzen, so lange das Hormon vorhanden ist.

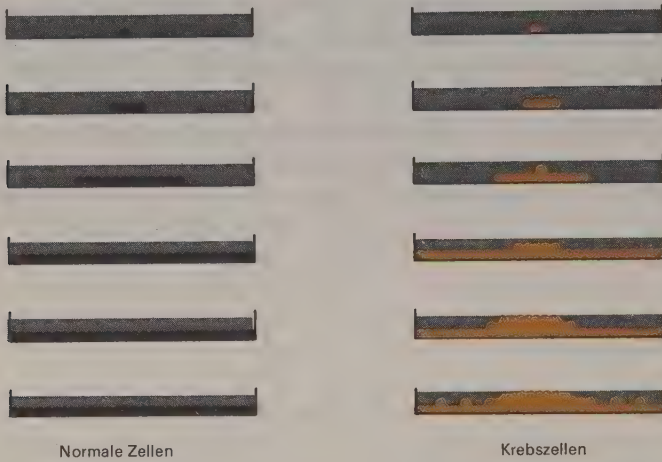
Der Unterschied zwischen einer Krebszelle und einer normalen Zelle ist daher oft nicht eine Frage des «alles-oder-nichts», sondern eine Frage der Häufigkeit der Teilung. Entweder kann sich die Krebszelle schneller als eine normale Zelle teilen oder es kann sein, daß, im Gegensatz zu einer normalen Zelle, die Krebszelle die Stimulierung durch ein spezifisches Hormon nicht braucht oder eine geringere Menge des Hormons benötigt, bevor sie mit der Teilung beginnt. Deshalb ist die einzige brauchbare Unterscheidung die, daß die Krebszelle den normalen Kontrollmechanismen, die einer Zelle befehlen, sich nicht zu teilen, weniger unterworfen ist.

### KONTAKTINHIBITION

Es gibt immer mehr Hinweise, daß bei Berührung von zwei tierischen Zellen häufig ein Signal entsteht, das die weitere Bewegung und in manchen Fällen die weitere Teilung beider Zellen beendet. Dieses Phänomen der *Kontaktinhibition* kann man beobachten, wenn isolierte Mäusezellen auf einer festen Glasoberfläche wachsen. Normale Zellen haben eine große Affinität für feste Oberflächen und bleiben am Glas haften, statt frei im Nährmedium herumzuschwimmen. Solange verhältnismäßig wenige Zellen vorhanden sind, geht die Teilung regelmäßig ungefähr einmal in 24 Stunden vor sich. Die Teilungsgeschwindigkeit verlangsamt sich oft, wenn die Zellen eine zusammenhängende Schicht (Monolayer) gebildet haben. Es scheint, daß sich diese Zellen nur teilen können, so lange sie nicht mit mehreren anderen Zellen in enger Berührung sind. Im Gegensatz dazu hört bei einer Vielzahl Krebszellen (aber nicht bei allen) das Wachstum nicht auf, wenn sich ein Monolayer gebildet hat, sondern die Krebszellen wachsen übereinander und bilden Massen von Zellen, die mehrere Schichten dick sind (Abbildung 18-1). Die Grundlage dieser Phänomene ist noch nicht klar. Sie könnten mit einer größeren Verbundfähigkeit der normalen Zellen zu tun haben. Wenn sie einander berühren, bleiben sie oft so fixiert, während viele Arten von Krebszellen viel weniger Affinität für andere Zellen haben und daher keine regelmäßigen Monolayers bilden.

*In vivo* könnte irgendein Kontrollsystem existieren, das normalen Zellen nur solange sie eine gewisse Bewegungsfreiheit haben, erlaubt, sich zu teilen. Das würde bedeuten, daß in dem Moment, in dem diese Bewegungsfreiheit verloren ginge (z.B. durch die Bildung eines zusammenhängenden Monolayers), das Zellwachstum aufhören würde. Die Kontaktinhibition ist offen-

sichtlich sinnvoll. Innerhalb eines multizellulären Organismus wäre es von Nachteil für eine Zelle, zu wachsen und sich zu teilen, ohne daß sie Platz hätte, sich zu bewegen.



**ABBILDUNG 18-1** Schematischer Vergleich der Vermehrung einer normalen Zelle und einer Krebszelle auf einer festen Oberfläche. Die normalen Zellen teilen sich, bis sie einen zusammenhängenden Monolayer bilden. Krebszellen jedoch haben oft weniger Affinität für die feste Oberfläche und bilden unregelmäßige Massen, die einige Schichten dick sind.

## MALIGNITÄT ALS VERLUST DER ZELLULÄREN AFFINITÄTEN

Die «Klebrigkeit» von Zellen, die bei der Kontaktinhibition festgestellt wurde, weist eine beträchtliche Spezifität auf. Eine bestimmte Art von Zelle (z.B. eine Leberzelle) zieht es vor, an anderen ihrer eigenen Art zu haften (z.B. anderen Leberzellen) und zeigt, wenn überhaupt, sehr geringe Affinität für andere Arten (z.B. Nierenzellen). Diese Art der Spezifität wurde sehr elegant in Versuchen gezeigt, in denen geringe Mengen des proteolytischen Enzyms Trypsin verwendet werden, um Organe wie die Leber und die Niere in Einzelzellkomponenten zu zerlegen. Wenn diese isolierten Zellen dann in Abwesenheit von Trypsin inkubiert werden, vereinigen sie sich wieder, um Gewebefragmente zu bilden, die denen im intakten Organ ähnlich sind, das heißt, kleine Fragmente von Lebergewebe und kleine Fragmente von Nierengewebe. Wenn Leber- und Nierenzellen miteinander gemischt werden, sind wiederum kleine Fragmente von Leber und Niere zu beobachten. Eine Vermischung von Nieren- und Leberzellen ist nicht zu beobachten. Somit zieht es eine Nierenzelle vor, an einer Nierenzelle zu haften und



eine Leberzelle, an einer Leberzelle. Wenn jedoch dieser Versuch mit Krebszellen wiederholt wird, sind die normalen zellulären Affinitäten nicht mehr gültig. Zum Beispiel führt die Vermischung von Zellen eines malignen Hautkrebses mit normalen Nierenzellen zu Aggregaten, die sowohl Nierenzellen als auch Hautkrebszellen enthalten. Ein Verlust der normalen zellulären Affinitäten ist wahrscheinlich der Grund, warum viele maligne Krebszellen viele verschiedene normale Organe befallen.

Die Ergebnisse, die man sowohl mit normalen als auch mit Krebszellen erhält, weisen auf dieselbe wichtige Schlußfolgerung hin. Die äußeren Oberflächen der Zellen spielen eine sehr wichtige Rolle, die richtige Position der Zellen in einem multizellulären Organismus sicherzustellen. Wenn die gegenwärtigen Vorstellungen über Kontaktinhibition richtig sind, ist die Bildung des richtigen zellulären Kontaktes auch von großer Bedeutung für die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt.

#### **SUCHE NACH CHEMISCHEN UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN NORMALEN ZELLEN UND KREBSZELLEN**

Fast zu gleicher Zeit, als die Wissenschaftler begannen, Moleküle innerhalb normaler Zellen zu beschreiben, untersuchten sie auch, ob die gleichen Moleküle in Krebszellen zu finden sind. Wenn heute eine neue chemische Reaktion (oder ein Enzym) in einer normalen Zelle beschrieben wird, untersucht man häufig, ob die gleiche Reaktion auch in Krebszellen abläuft. Oft scheinen diese Untersuchungen erfolgreich zu sein; die Tumorzellen enthalten viel mehr (oder weniger) eines bestimmten Bestandteils als die entsprechende normale Zelle. Eine darüber hinausgehende Analyse führte jedoch bisher immer zu Enttäuschungen. Eine der Schwierigkeiten bei dieser Art von Analyse ist, daß sich, wenn wir eine Veränderung beobachten, die Frage ergibt: Sollen wir die Veränderung als die primäre metabolische Störung ansehen oder als Sekundärantwort auf den veränderten Stoffwechsel, der durch die primäre Veränderung hervorgerufen wurde? Außerdem fehlt in vielen solchen Versuchen eine gute Kontrolle mit der man die Tumorzelle vergleichen kann, da wir nicht sicher sein können, in welcher Art von normaler Zelle die Transformation zur Krebszelle stattgefunden hat. Auch ist unsere einzige Vergleichsmöglichkeit oft die mit isolierten Zellen, die in Gewebekulturen wachsen. Das sind jedoch nicht unbedingt gute Vergleichsmaßstäbe, da normale Zellen während ihrer Anpassung an das Wachstum in der unnatürlichen Umgebung der Gewebekulturen unter Umständen eine Anzahl von genetischen Veränderungen durchgemacht haben.

## WARBURG UND DIE BEDEUTUNG ERHÖHTER GLYKOLYSE

Nichtsdestoweniger ist ein wirklich bedeutsamer biochemischer Unterschied vielleicht schon bekannt. Dies ist die Tatsache, daß viele Arten von Tumorzellen viel größere Mengen von Milchsäure ausscheiden als die entsprechenden normalen Zellen. Sie tun dies, wenn sie als solide Tumoren in Tieren wachsen und auch, wenn sie sich als einzelne Zellen in Gewebekulturen vermehren. Das Interesse an dieser Tatsache reicht fast fünfzig Jahre bis in die 20er Jahre zurück, als der deutsche Biochemiker Warburg sie zum ersten mal sorgfältig erforschte. Seither wurde die Bedeutung der Überproduktion von Milchsäure (oft der *Warburgeffekt* genannt) immer wieder untersucht, aber ihre wahre Bedeutung ist leider noch ungewiß. Die metabolische Herkunft der überschüssigen Milchsäure ist jedoch bekannt. Sie bildet sich aus Glucose über den Glucoseabbau. Aber diese verstärkte Gärung (Metabolismus ohne Verwendung von Sauerstoff) rührt nicht von einem Mangel an irgendwelchen Enzymen her, die bei den verschiedenen oxydativen Prozessen beteiligt sind (z.B. läuft die oxydative Phosphorylierung normal ab). Trotzdem wird von diesen Tumorzellen mehr Glucose verbraucht als sie normalerweise benötigen, um zu wachsen und sich zu vermehren.

Dies deutet auf den Verlust des normalen Kontrollmechanismus hin, der die Geschwindigkeit reguliert, mit der Glucose in eine Zelle aufgenommen wird. Leider weiß, trotz vieler Jahre biochemischer Arbeit, niemand wirklich, wie der Glucoseverbrauch reguliert wird. Man könnte sich vorstellen, daß den Tumorzellen ein oder mehrere spezifische Oberflächenproteine fehlen, die sowohl die Glucoseaufnahme als auch die «Klebrigkeit» kontrollieren, die den Zellen die richtige zelluläre Affinität gibt. Aber sogar wenn diese Hypothese stimmt, kann es bis zum Beweis noch Jahre dauern, da die wirkliche Morphologie der äußeren Zellmembranen auf molekularer Ebene noch fast völlig im Dunkeln liegt.

## TUMOR-SPEZIFISCHE ANTIGENE

Wegen des Fehlens eines echten chemischen Ansatzes zum Studium der Zelloberfläche, wurde viel Aufmerksamkeit der Frage gewidmet, ob immunologische Methoden spezifische antigene Unterschiede zwischen normalen und Tumorzellen aufzeigen würden. Während es in der Literatur überaus viele positive Berichte über neue Tumor-spezifische Antigene gibt, wurden sie bis vor kurzer Zeit nicht ernst genommen. Gegen ihre Bedeutung, wenn nicht sogar Existenz, sprach der Glaube, daß die Gegenwart von neuen Tumorantigenen die selektive Synthese von Antikörpern induzieren würde, was jede neu entstehende Krebszelle zerstören würde. Und da Tumoren

auf den ersten Blick unkontrolliert in ihrem Wirt wachsen, dürften sie keine signifikanten antigenen Unterschiede zu den normalen Zellen haben, von denen sie abstammen.

Heute jedoch nimmt man immer mehr an, daß das Wachstum von Tumoren *in vivo* trotz des Auftretens neuer antigener Determinanten (Marker) stattfindet. Es wird dabei weiterhin angenommen, daß die meisten tierischen Tumoren, die zu wachsen beginnen, schnell zerstört werden, und daß es nur die außergewöhnliche Krebszelle ist, gegen die tierische Wirtszellen nicht reagieren können. Warum die Antikörperreaktion des Wirts in diesen seltenen Fällen versagt, ist nicht klar, obwohl bekannt ist, daß die Fähigkeit, auf wohldefinierte Antigene zu reagieren, oft große individuelle Schwankungen innerhalb derselben Spezies zeigt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Variabilität weitgehend genetisch bedingt ist. Sicherlich ist heute klar, daß die Verwendung von immunsuppressiven Medikamenten zu einem großen Ansteigen der Zahl «spontaner» Tumoren führt und wir glauben heute, daß die meisten von ihnen sich unter normalen Bedingungen als Resultat des Angriffs durch die Antikörper des Wirts rückgebildet hätten. Somit hing die Evolution der Wirbeltiere mit ihren relativ langen Lebenszeiten von der Entwicklung einer Immunreaktion gegen Krebs ab. Es ist denkbar, daß die Verwendung von Antikörpern zur Bekämpfung mikrobieller Infektionen als zufälliges Nebenprodukt eines Systems entstand, das ursprünglich selektioniert wurde, um Tiere gegen Krebs zu verteidigen.

#### SELEKTIVE PRÄZIPITATION VON KREBSZELLEN DURCH EIN PFLANZLICHES GLYKOPROTEIN

Ein anderes Anzeichen dafür, daß die Oberflächen von Tumorzellen sich von denen normaler Zellen unterscheiden, kommt von Versuchen, die der zufälligen Beobachtung nachgingen, daß ein aus Weizensamen isoliertes Glykoprotein selektiv viele Arten von Tumorzellen agglutiniert. Im Gegensatz dazu verbinden sich ihre normalen Zellvorfahren nicht mit dem Glykoprotein. Es läßt sich zeigen, daß die krebsspezifische Oberflächenstruktur N-Acetylglucosamin enthält. Ihre Verbindung mit dem Agglutinin ist reversibel, eine enzymatische Wirkung spielt keine Rolle und das Wachstum der agglutinierten Zellen wird nicht beeinflusst. Diese Tatsachen führen zu der Frage, ob die selektive Reaktion der Tumorzellen aufgrund der Anwesenheit einer neuen Komponente stattfindet, die in normalen Zellen fehlt, oder ob Komponenten eine Rolle spielen, die in normalen Zellen vorhanden sind, aber durch die gleichzeitige Anwesenheit einer anderen Komponente irgendwie «maskiert» sind. Derzeit wird die «Maskierungshypothese» favorisiert, da eine kurze Behandlung von normalen Zellen mit mehreren verschiedenen

proteolytischen Enzymen (z.B. Trypsin und Chymotrypsin) sie in eine durch das spezifische Glykoprotein agglutinierbare Form umwandelt. Dies deutet darauf hin, daß vielen Krebszellen ein normaler Proteinbestandteil der äußeren Zellmembran fehlt.

## KREBSERREGUNG DURCH STRAHLUNG UND CHEMIKALIEN

Es ist offensichtlich, daß ein wesentliches Erfordernis für die zufriedenstellende chemische Analyse von Krebszellen die Verfügbarkeit von Agenzien ist, deren Zugabe *in vitro* (d.h. in Gewebekulturen) eine normale Zelle in eine Krebszelle umwandeln kann. Wir kennen schon viele Beispiele, in denen ein von außen zugegebenes Agens die Häufigkeit von Tumoren in lebenden Tieren wesentlich steigert. Diese krebserregenden Mittel werden *Karzinogene* genannt. Zu den stärksten Karzinogenen gehören die verschiedenen Formen der Strahlung. Röntgenbestrahlung der Schilddrüse zum Beispiel erhöht das Auftreten von Schilddrüsenkrebs beträchtlich. Jedoch kann keine der verschiedenen Strahlungen verwendet werden, um alle Zellen in einer der Strahlung ausgesetzten Population krebskrank zu machen. Nur ein kleiner Teil wird beeinflusst. So scheint die Strahlung noch kein brauchbares Mittel zu sein, um die Biochemie der primären Ereignisse zu studieren, die mit dem Übergang vom normalen in den krebskranken Zustand einhergehen. Die meisten Chemikalien, die Tumoren in Tieren hervorrufen, transformieren ebenfalls nur einen kleinen Prozentsatz der exponierten Zellpopulation.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Analyse der biochemischen Vorgänge, die während der Bestrahlung oder der chemischen Krebserzeugung ablaufen, ist, daß beide Methoden sehr toxisch sind und zweifellos neben den krebserregenden Veränderungen viele andere Veränderungen verursachen. Was die Biochemiker brauchen, ist ein Mittel, dessen primäre Wirkung die Veränderung zu unbegrenztem Wachstum verursacht. Zum Glück erfüllt, wie wir bald sehen werden, die Karzinogenese durch Virusinfektion diese Forderung. Bevor wir jedoch besprechen, wie Viren wirken, müssen wir uns zuerst fragen, wie die Krebszelle ihre krebsspezifische Eigenschaft aufrecht erhält.

## KREBS ALS ERBLICHE VERÄNDERUNG

Wenn sich eine Krebszelle teilt, sind die zwei Tochterzellen für gewöhnlich morphologisch identisch mit der Elternzelle. Der Faktor (die Faktoren), der Krebszellen ihr wesentliches Charakteristikum des unbeschränkten Wachstums verleiht, wird somit regelmäßig von den Eltern an die Tochterzellen weitergegeben. Diese veränderte Eigenschaft bleibt nicht nur in Tumoren



erhalten, die in intakten Tieren wachsen, sondern auch in Tumorzellen, die in Gewebekultur wachsen. Hunderte von Generationen können ohne nennenswerte Rückkehr zum normalen Zustand in Gewebekulturen ablaufen. Die Dauerhaftigkeit solcher Veränderungen wird nicht nur durch die Weitergabe einer typischen Morphologie gezeigt, sondern auch durch die Fähigkeit der Tochterzellen, neue Tumoren hervorzurufen, wenn man sie in ein tumorfreies Tier injiziert, das genetisch dem Donator der ursprünglichen Gewebekulturzellen ähnelt.

Wegen der Vererbbarkeit der Veränderungen, die unbegrenztes Wachstum erlauben, müssen wir die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß eine Änderung an den Chromosomen selbst stattgefunden hat. Eine direkte Überprüfung dieser Annahme sollte mit Hilfe der Methode der Fusion von Krebszellen und normalen Zellen durch Sendaivirus bald möglich sein. Nach der Bildung von tetraploiden ( $4n$ ) verschmolzenen Kernen führen nachfolgende, unregelmäßige mitotische Teilungen zu Zellen mit geringeren Chromosomenzahlen und man hofft, daß die Krebseigenschaft mit der Anwesenheit von einem oder mehreren spezifischen Chromosomen in Zusammenhang gebracht werden kann. Derzeit wird viel Mühe aufgewendet, dieses Ziel zu erreichen, sodaß wir vielleicht in nächster Zukunft einen klaren Beweis dieser Hypothese bekommen.

Als Alternative können wir uns die krebsartige Veränderung als ein Beispiel irreversibler Differenzierung vorstellen. Das heißt, der Mechanismus, der die Transformation zur Krebszelle permanent macht, könnte jenen ähnlich sein, die sicherstellen, daß sich z.B. eine Nervenzelle immer als Nervenzelle vermehrt. Wir können jedoch dieser Hypothese nicht wirklich nachgehen, da, wie wir im vorigen Kapitel betonten, bis jetzt noch niemand weiß, wie Zellen sich irreversibel differenzieren.

## SOMATISCHE MUTATIONEN ALS MÖGLICHE KREBSURSACHEN

Wenn die wesentlichen Veränderungen, die Zellen zu Krebszellen machen, auf dem Chromosom stattfinden, ist es möglich, sich zwei völlig unterschiedliche Mechanismen für ihr Auftreten vorzustellen. Der erste Mechanismus postuliert, daß somatische Mutationen (Mutationen, die in Zellen auftreten, die nicht dazu bestimmt sind, Geschlechtszellen zu werden) die wesentliche Veränderung ausmachen. Nach diesem Schema könnte eine somatische Mutation Krebs verursachen, wenn ihr Auftreten einen normalen Kontrollmechanismus, der die Zellteilung reguliert, stört. Anhänger dieser Hypothese glauben, daß im allgemeinen mehrere somatische Mutationen erforderlich sind, um Krebs hervorzurufen. Diese Idee basiert auf der Tatsache, daß die Krebshäufigkeit mit dem Alter sehr zunimmt. Dieses Phänomen wäre

dadurch zu erklären, daß in einer bestimmten Zelle mehrere Mutationen auftreten müßten, zeitlich ganz zufällig, bevor sie eine vollausgewachsene Krebszelle wird. Gegenwärtig gibt es keine direkten Beweise für oder gegen diese Theorie, die wir am besten als Krebs aufgrund des Verlustes einer oder mehrerer essentieller Genfunktionen beschreiben könnten. Auch ohne experimentellen Beweis ist jedoch klar, daß somatische Mutationen auftreten müssen; es wäre überraschend, wenn nicht zumindest einige davon die normale Kontrolle der Zellteilung unterbrechen würden.

### VIREN ALS KREBSURSACHE

Als Alternative besteht die Hypothese, daß viele Tumoren durch Viren hervorgerufen werden. In gewissem Sinn ist das nicht wirklich eine Hypothese, da es schon überzeugende Beweise gibt, daß eine Anzahl von Tumoren in Tieren, von Fischen bis zu Säugetieren, durch Viren induziert werden. Die relevante Frage ist daher nicht, ob Viren Krebs hervorrufen können, sondern ob ein beträchtlicher Teil der Tumoren durch Viren induziert wird. Bis vor kurzem gab es keine vernünftige Vorstellung darüber, wie Viren Krebs erregen könnten. Heute erkennen wir, hauptsächlich durch die Arbeiten mit Bakterienviren, daß ein neues Stück genetischen Materials in die Zelle gebracht wird, wenn ein Virus in eine Zelle eindringt. Normalerweise betrachten wir Viren als Lebewesen, deren Vermehrung unweigerlich Zellen tötet. Die Infektion einer Zelle mit einem Tumovirus tötet jedoch die Wirtszelle häufig nicht. Wie wir bald zeigen werden, ist daher die Vermutung zulässig, daß der wesentliche Aspekt der viralen Karzinogenese die *Einführung neuen genetischen Materials* ist, im Gegensatz zu somatischen Mutationen, von denen wir annehmen, daß sie meist einen Verlust von funktionellem genetischen Material hervorrufen.

Gegenwärtig scheint es sehr wahrscheinlich, daß nicht alle Tumoviren auf die gleiche Art und Weise wirken. Zum Beispiel werden viele verschiedene Krebsarten durch Viren hervorgerufen, die RNA enthalten. Das am besten bekannte RNA-Virus ist das Rous-Sarkomvirus, das solide Tumoren in Hühnern erzeugt (ein Sarkom ist ein Bindegewebstumor). Gewisse andere RNA-Viren rufen höchstwahrscheinlich Leukämie in Vögeln und in Säugetieren, einschließlich des Menschen, hervor. Mehrere Gruppen von DNA-Viren wirken ganz anders. Eine Gruppe ist für warzenartige Gewächse auf der Haut vieler verschiedener Säugetiere, von Nagetieren bis zum Menschen, verantwortlich. Andere nah verwandte DNA-Viren, von denen die am besten bekannten ein Mäusevirus namens Polyoma und ein Affenvirus, SV40 genannt, sind, können viele verschiedene Tumoren erzeugen, wenn man sie in neugeborene Tiere injiziert. Später werden wir unsere Aufmerksam-

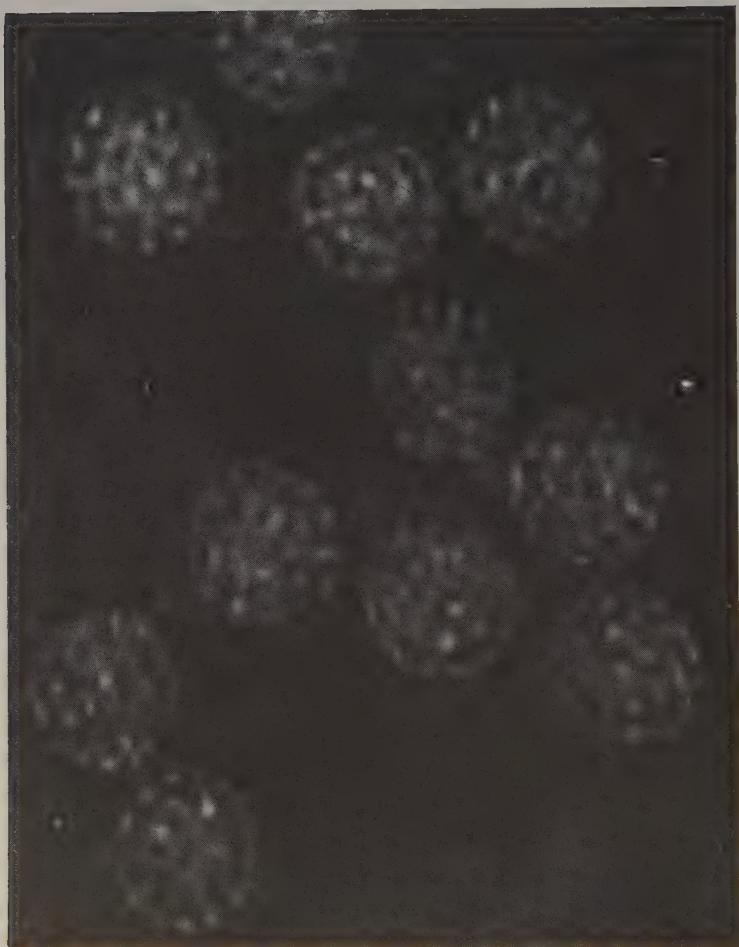
keit zuerst auf Polyoma (SV40) und dann auf das Rousvirus lenken, um zu zeigen, daß es jetzt möglich ist, konkrete Hypothesen auf molekularer Ebene darüber zu formulieren, wie sie die Transformation zu Krebszellen hervorrufen.

### **DIE SEHR EINFACHE STRUKTUR EINER POLYOMA (SV40)-PARTIKEL**

Polyoma ist ein sphärisches Virus, das sich normalerweise in Mäusen vermehrt. Es gehört zu den kleinsten DNA-haltigen Viren, mit einem Molekulargewicht von ungefähr 25 Millionen. Es besitzt eine äußere Proteinhülle, die nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen aus 72 morphologisch identischen Proteinuntereinheiten aufgebaut ist (Abbildung 18-2). Jede dieser Untereinheiten ist wiederum aus fünf oder sechs kleineren Proteinmolekülen aufgebaut, was eine Gesamtsumme von ca. 420 Proteinmolekülen in der Hülle ergibt. Man weiß noch nicht, ob diese Einheiten mit einem  $MG \sim 40.000$  aus mehr als einer Polypeptidkette bestehen. Jede Hülle enthält ein einziges zirkuläres doppelhelikales DNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von ungefähr 3 Millionen und einer Länge von  $1,6 \mu$  (Abbildung 18-3). Ebenfalls innerhalb der Hülle befindet sich ein kleines basisches Protein, höchstwahrscheinlich eng mit dem DNA-Chromosom verbunden. Man weiß viel weniger darüber als über die Hüllproteine. Sein Molekulargewicht dürfte schätzungsweise 15.000 betragen.

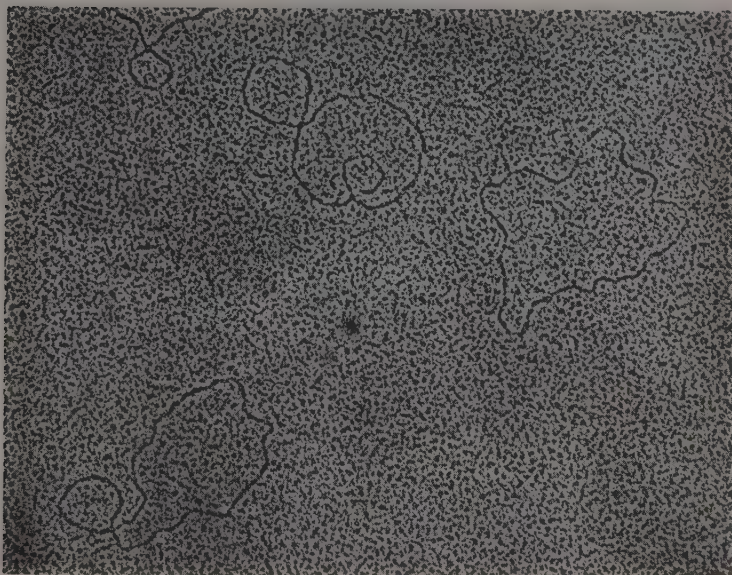
Praktisch identisch in Aussehen und grundlegendem Aufbau mit Polyoma ist SV40, ein Virus, das sich in Affen vermehrt. Ebenso wie Polyoma kann es Krebs erzeugen und wird gegenwärtig sehr intensiv untersucht. In allen wichtigen Aspekten (mit Ausnahme ihres Wirtbereiches) verhalten sich Polyoma und SV40 biologisch identisch und so gelten Ergebnisse, die mit dem einen Virus erhalten wurden, gewöhnlich auch für das andere.

Da nur ungefähr 5000 Nukleotide in dem Polyoma (SV40)-Chromosom vorhanden sind, beträgt die maximale Anzahl der Aminosäuren, die es codieren kann, ungefähr 1600. Unter der plausiblen Annahme, daß sowohl die Hülle als auch die internen Proteine durch das virale Chromosom codiert werden, werden ungefähr 40 Prozent des gesamten Genoms für strukturelle Proteine angewendet. Dies läßt ungefähr 3000 Nukleotide übrig, um die verschiedenen Enzyme zu codieren, die für die Vermehrung von Polyoma nötig sind. Selbst wenn sie kleiner als normal wären, ist es unwahrscheinlich, daß die Anzahl der Polyoma-spezifischen Enzyme mehr als fünf oder sechs beträgt. Die Zahl seiner Gene ähnelt somit sehr derjenigen kleiner einsträngiger DNA-Phagen, deren Chromosomen je ungefähr sieben bis acht Gene enthalten. Polyoma (SV40) hat somit eine ebenso einfache genetische Struktur wie alle bekannten DNA-Viren (Abbildung 18-4).



**ABBILDUNG 18-2** Elektronenmikroskopische Aufnahme (mit freundlicher Genehmigung von L. V. Crawford, Institute of Virology, Glasgow) von Polyomaviruspartikeln. Der Virusdurchmesser beträgt ungefähr 500 Å. Sorgfältige Beobachtung ergibt, daß für den Aufbau der äußeren Proteinhülle 72 Untereinheiten verwendet werden. Zwei der Partikeln (links unten) werden durch ein Antipolyoma-Antikörpermolekül zusammengehalten.



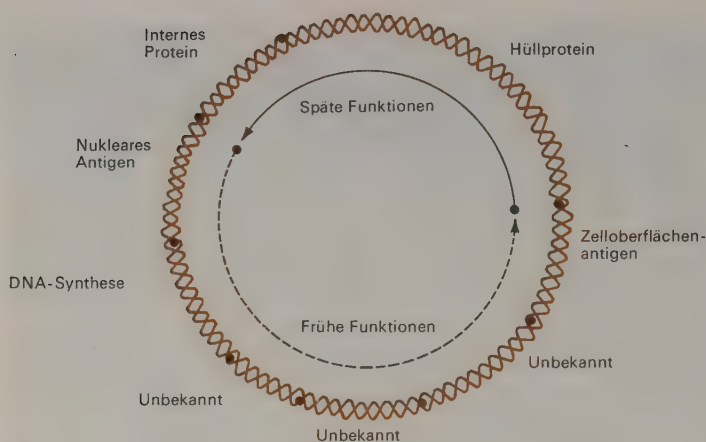


**ABBILDUNG 18-3** Elektronenmikroskopische Aufnahme (mit freundlicher Genehmigung von W. Stoeckenius, Rockefeller Institute) mehrerer Moleküle gereinigter Polyoma-DNA. Alle haben deutlich zirkuläre Gestalt. Die DNA Konturlänge ist  $1,6 \mu$ , was  $3 \times 10^6$  Daltons entspricht.

## LYTISCHE INFEKTION GEGENÜBER TRANSFORMATION

Wenn ein Polyomavirus in eine empfängliche Zelle einer Maus eindringt, verschwindet es für gewöhnlich spurlos. Weniger häufig ( $10^{-2}$ ) vermehrt es sich wie ein konventionelles Virus und erzeugt dabei eine große Anzahl von neuen Viruspartikeln. Der Produktionsort innerhalb seiner Wirtszelle ist der Kern, der schließlich mit ungefähr einer Million von Nachkommenschaftspartikeln total gefüllt wird. Während dieses Prozesses, der bei  $37^\circ\text{C}$  ungefähr 24 bis 48 Stunden in Anspruch nimmt, werden die normalen Kernfunktionen gestört und die infizierte Zelle muß sterben (eine lytische Infektion). Noch weniger häufig ( $10^{-5}$ ) dringt das Virus in eine Zelle ein, ohne jedoch Nachkommenschaft zu bilden. Statt dessen wird die infizierte Zelle in eine morphologisch unterscheidbare Krebszelle umgewandelt.

Sowohl lytische als auch transformierende Reaktionen sind außerhalb lebender Tiere, in Gewebekultur, zu beobachten. Bei diesen Versuchen läßt man Gewebekulturzellen (oft von Mäuseembryonen) auf einer Glasoberfläche

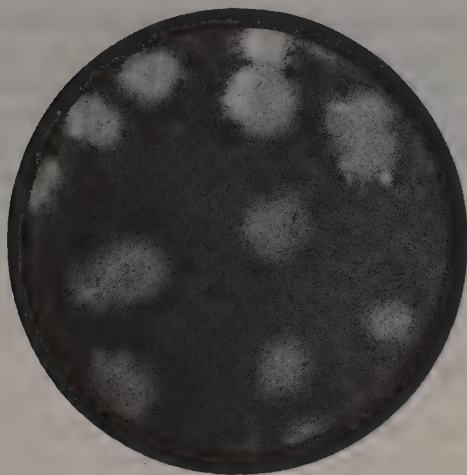


**ABBILDUNG 18-4** Die genetische Struktur von Polyoma (SV40). Die relative Anordnung und die Größen der verschiedenen Gene müssen erst festgestellt werden. Man nimmt an, daß 8 verschiedene Gene existieren. Falls die Proteinprodukte kleiner sind als die anderer bekannter Gene, wird die Genanzahl dementsprechend größer sein.

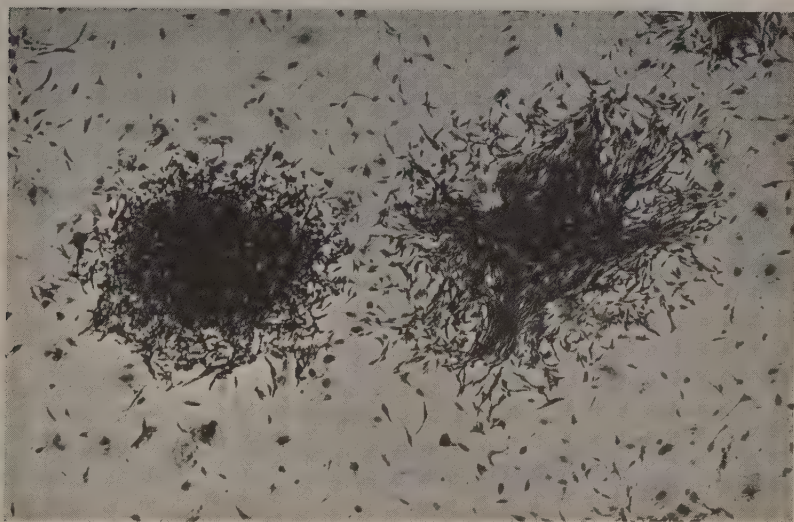
in Nährlösung wachsen. Eine Anzahl von Polyomapartikeln wird dann hinzugefügt. Einige dieser Partikeln vermehren sich in den Zellen und produzieren Nachkommenschaftspartikeln, die sich dann an benachbarte Zellen adsorbieren und einen kreisförmigen Bereich abgestorbener Zellen erzeugen, ähnlich den Plaques, die durch Bakterienviren gebildet werden (Abbildung 18-5). Wenn andererseits das Virus eine Gewebekulturzelle transformiert, beginnt die transformierte Zelle sich in der desorganisierten und leicht zu identifizierenden Art der Krebszelle zu vermehren (Abbildung 18-6). Im Fall der transformierten Zelle ist das offensichtliche Fehlen der Kontaktinhibition besonders auffällig, was zur Bildung von Gruppen von Zellen führt, die sich unregelmäßig übereinander häufen.

#### PERMISSIVE GEGENÜBER NICHTPERMISSIVEN ZELLEN

Zellen, in denen sich ein spezifisches Virus vermehrt, werden *permissive* Zellen genannt, während Zellen, in denen keine Virusvermehrung stattfindet, *nichtpermissive* Zellen genannt werden. Eine permissive Zelllinie wird für gewöhnlich aus einem Tier gewonnen, in dem sich ein bestimmtes Virus normalerweise vermehrt. Im Gegensatz dazu stammen nichtpermissive Zelllinien von Tieren, die unfähig sind, ein bestimmtes Virus zu vermehren.



**ABBILDUNG 18-5** *Plaques von Polyomavirus. Polyomapartikeln wurden zu Zellen von Mäuseembryos zugegeben, die auf einer Glasoberfläche wuchsen. Die Plaques, die nach 25 Tagen Inkubationszeit sichtbar wurden, stellen zusammenhängende Massen von toten Zellen dar, die sich anders färben als wachsende Zellen. [Von Crawford und Diamond, Virology, 22, 235 (1964) mit Genehmigung.]*



**ABBILDUNG 18-6** *Klone aus transformierten (links) und normalen (rechts) Zellen von Mäuseembryonen. Die transformierten Zellen häufen sich übereinander und bilden dabei eine dickere (dunklere) Masse als normale Zellen (mit freundlicher Genehmigung von M. Stoker, Institute of Virology, Glasgow, Schottland).*



Daher kann eine Zelle, abhängig von dem spezifischen Virus, entweder permissiv oder nichtpermissiv sein. Zum Beispiel ist die wohlbekannte Mäusezelllinie 3T3 für Polyoma, ein Mäusevirus, permissiv, aber für SV40, ein Affenvirus, nichtpermissiv. Im Gegensatz dazu vermehrt sich SV40 nicht, wenn es eine 3T3 Zelle infiziert, sondern führt manchmal zur Zelltransformation. Wenn Polyoma die nichtpermissive Hamsterzelllinie BHK (baby hamster kidney, Nieren neugeborener Hamster) infiziert, kann es transformieren, aber sich nicht vermehren; BHK-Zellen werden daher häufig bei Transformationsversuchen mit Polyoma verwendet.

### FRÜHE UND SPÄTE POLYOMA MESSENGERS

Der Lebenszyklus von Polyoma, wie der von Phagen, kann in frühe und späte Stadien unterteilt werden. Das frühe Stadium wird durch die Synthese mehrerer Virus-spezifischer Proteine gekennzeichnet, von denen eins ein starkes Antigen ist (das «T»-Antigen), das sich im Kern in großen Mengen anhäuft. Die genauen Stoffwechselfunktionen aller frühen Polyomaproteine müssen erst ausgearbeitet werden. Während der späten Stadien der Infektion findet die Synthese der Nachkommenschaft-DNA und der Strukturproteine von Polyoma statt.

Dementsprechend kann die Virus-spezifische mRNA durch DNA-RNA-Hybridisierungsversuche in frühe und späte Komponenten unterteilt werden. Die Synthese der frühen mRNA tritt sogar dann auf, wenn die Proteinsynthese zum Zeitpunkt der Infektion blockiert ist, was darauf hinweist, daß sie durch ein wirtsspezifisches RNA-Polymerasemolekül transkribiert wird. Wenn die Proteinsynthese blockiert ist, wird kein spätes mRNA-Molekül synthetisiert, was anzeigt, daß irgendein Virus-spezifisches Enzym gemacht werden muß, um die späten Gene abzulesen.

Auf den ersten Blick ist eine höchst ansprechende Möglichkeit die, daß eines der frühen Polyomagene einen Faktor codiert, der für die späten Gene spezifisch ist. Gegen diesen Gedanken spricht die Größe der verschiedenen in Bakterien gefundenen  $\sigma$ 's. Alle haben Molekulargewichte von ungefähr 80.000, mit einzelnen Polypeptidketten aus ungefähr 750 Aminosäuren. Wenn die Polymerase-Cores der Säugetiere  $\sigma$ 's von ähnlicher Größe erfordern, würde ein Polyoma-spezifisches  $\sigma$  für sein Codieren fast das gesamte Polyomagenom benötigen, das nicht für seine Strukturproteine gebraucht wird. So ist es weiterhin wahrscheinlich, daß die Transkription der späten, ebenso wie der frühen Polyoma-mRNA wirtsspezifische  $\sigma$ 's erfordert. Es bleibt somit völlig rätselhaft, wie der Übergang von frühen zu späten Polyomafunktionen bewerkstelligt wird.



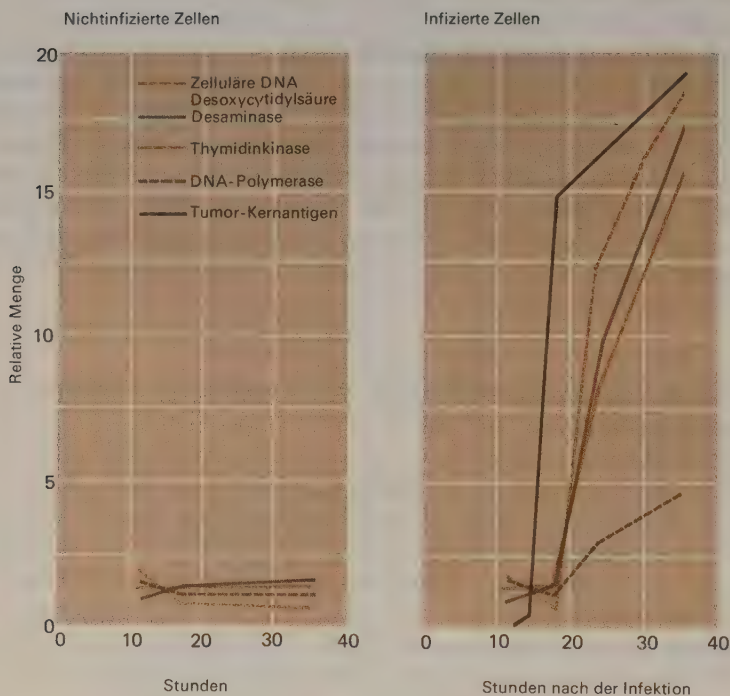
## DIE POLYOMAGENETIK STECKT NOCH IN DEN KINDERSCHUHEN

Im Vergleich zu den besser bekannten Phagen ist die genetische Organisation von Polyoma nur unzureichend bekannt. Eine Anzahl von temperatursensitiven Mutanten wurde nach Behandlung mit dem Mutagen salpetrige Säure isoliert und Komplementierungsversuche deuten darauf hin, daß Mutationen in vier verschiedenen Genen erzeugt wurden. Keines der Proteinprodukte, die diesen Genen entsprechen, wurde identifiziert. Zwei scheinen früh zu wirken, da sie für virale DNA-Synthese nötig sind, während die zwei anderen höchstwahrscheinlich die Strukturproteine des Virus codieren. Offensichtlich sind noch viel mehr genetische Untersuchungen nötig.

## INDUKTION VON WIRTSENZYMEN, DIE AN DER DNA-SYNTHESE BETEILIGT SIND

Polyoma kann sich entweder in Zellen vermehren, die DNA aktiv synthetisieren ( $S_1$  Stadium) oder in kontaktinhibierten Zellen, deren DNA-Synthese aufgehört hat. Vermehrung in den inhibierten Zellen tritt auf, obwohl diesen Zellen vor der Infektion viele Enzyme fehlen (z.B. CDP-Reduktase, dTMP-Synthetase und DNA-Polymerase), die verwendet werden, um die verschiedenen Nukleotidstufen der DNA zu synthetisieren oder sie zu verknüpfen. Die Infektion mit Polyoma muß daher die Synthese dieser Enzyme spezifisch induzieren. Eines der frühen Polyomagene codiert ein Enzym, das den zellulären Kontrollmechanismus enthemmt, der normalerweise die Synthese der «DNA-Enzyme» abschaltet, wenn ihre Gegenwart nicht mehr gebraucht wird. Wir haben noch keine Ahnung, wie dies geschieht.

Die Induktion der «DNA-Enzyme», die ungefähr 8 bis 12 Stunden nach der Infektion stattfindet, regt nicht nur die Polyoma-DNA-Synthese an, sondern auch, in großem Ausmaß, die Synthese von Wirts-DNA (Abbildung 18-7). Die spezifischen Signale, die dazu führen, daß sich ein zirkuläres Polyomachromosom zu vermehren beginnt, wirken auch auf die vielen Wirtschromosomen. Diese zuerst überraschende Beobachtung erscheint sinnvoll, wenn man die genetische Herkunft der «DNA-Enzyme» in Betracht zieht. Sie müssen durch Wirtschromosomen codiert werden, da das Polyomachromosom bei weitem nicht groß genug ist, um diese Aufgabe zu übernehmen: Alle diese Enzyme zu codieren, würde eine Größe erfordern, die viel eher der von  $\lambda$ -DNA (10 mal größer als Polyoma) entspricht.



**ABBILDUNG 18-7** Induktion von Enzymen, die an der DNA-Synthese beteiligt sind, nach der Infektion von permissiven Affenzellen durch das SV40 Virus. Bevor diese Zell-codierten Enzyme auftreten, hat die Synthese des Virus-spezifischen Proteins, des «T» Kernantigens begonnen. (Gezeichnet nach Dulbecco, Scientific American, April, 1967).

## ABORTIVE INFEKTIONEN GEHEN DER TRANSFORMATION VORAUS

Viele der Polyomapartikeln, die nichtpermissive BHK-Zellen infizieren, durchlaufen die ersten Stadien der Vermehrung. Frühe Polyoma-mRNA wird hergestellt, ebenso wie das nukleäre Polyoma-Antigen. Jedoch werden weder virale DNA noch Strukturproteine synthetisiert. Ebenso sind keine Spuren von später Polyoma-mRNA zu entdecken. Aus irgendeinem bis jetzt unbekannten Grund lassen die nichtpermissiven Zellen nicht zu, daß späte mRNA transkribiert wird.

## EINE PARTIKEL KANN EINE ZELLE TRANSFORMIEREN

Wenn Polyomapartikeln zu nichtpermissiven Zellen zugegeben werden, ist die Zahl der transformierten Zellen der Menge des zugegebenen Virus direkt proportional. Wenn eine gewisse Anzahl von Partikeln eine von tausend Zellen transformiert, dann transformiert das Zehnfache dieser Anzahl eine in hundert Zellen. Dieses Verhältnis sagt uns, daß eine einzige Partikel vollkommen genügt, um diese Aufgabe zu erfüllen. Durch eine ausreichende Zahl von Partikeln können alle betroffenen Zellen transformiert werden, was zeigt, daß alle Zellen, die in der Kultur wuchsen, zur Transformation fähig sind. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine einzige Polyomapartikel die Transformation hervorruft, sehr, sehr gering. Für gewöhnlich müssen einige zehntausende infizierender Partikeln anwesend sein, um die durchschnittliche Zelle mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 Prozent zu einer Krebszelle zu transformieren

## ABWESENHEIT INFEKTIÖSER POLYOMAPARTIKELN IN TRANSFORMIERTEN ZELLEN

In transformierten Zellen gibt es keine infektiösen Polyomapartikeln. Es ist natürlich nicht überraschend, daß die Kerne der transformierten Zellen nicht mit Viruspartikeln angefüllt sind. Das würde wahrscheinlich zum Tod der Zelle führen. Tatsache ist jedoch, daß *überhaupt* keine Partikeln zu entdecken sind. Hier besteht eine offensichtliche Analogie zu den lysogenen Bakterienviren (vergleiche Kapitel 7). Auch lysogene Phagen haben zwei Möglichkeiten offen. Sie können sich lytisch vermehren oder sie können durch Crossing-over ein Teil des Wirtschromosoms werden.

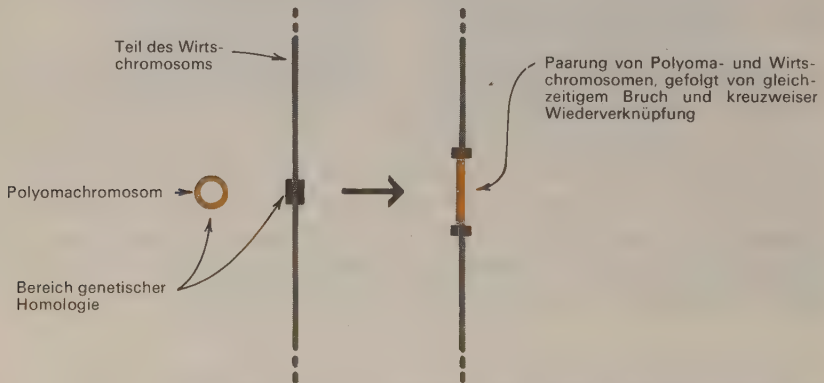
## DIE TRANSFORMATION ERFORDERT DIE INTEGRATION VON POLYOMA (SV40)-DNA IN WIRTSCHROMOSOMEN

Einige neue Versuche zeigen tatsächlich deutlich die Existenz Polyoma-spezifischer (SV40-spezifischer) DNA, die in die DNA der Wirtszellchromosomen eingebaut wurde. Untersuchungen mit DNA-RNA-Hybridisierung zeigen die Anwesenheit von Polyoma (SV40)-DNA-Sequenzen in der aus transformierten Zellen isolierten DNA. Wenn im Gegensatz dazu DNA aus normalen Zellen untersucht wurde, waren keine Polyomasequenzen zu entdecken. Diese eingebaute DNA stammt eindeutig aus dem Kern, nicht aus einer zytoplasmatischen (Mitochondrien?) Organelle. Außerdem muß sie im Kern kovalent an Chromosomen-DNA gebunden sein, da sorgfältige Extraktionsmethoden

zeigen, daß die DNA-Sequenzen, die mit Polyoma-mRNA hybridisieren, ein Teil außergewöhnlich langer DNA-Moleküle sind ( $MG > 10^9$ ).

Innerhalb eines einzigen Kerns gibt es ungefähr 5 bis 60 Exemplare von Polyoma (SV40)-DNA. Ob sie nebeneinander lokalisiert sind und so Tandemduplikationen eines ursprünglichen Exemplars darstellen oder ob sie auf vielen verschiedenen Chromosomen vorhanden sind, muß noch geklärt werden. Die Tatsache, daß die Transformation für gewöhnlich durch eine einzige Viruspartikel hervorgerufen wird, spricht jedoch für die Hypothese der im Tandem angeordneten Kopien. Es sollte bald möglich sein, die verschiedenen Wirtschromosomen in Kategorien verschiedener Größe zu unterteilen und zu sehen, ob sich die Polyomagenome immer mit Chromosomen derselben Größe verbinden.

Die an der Insertion beteiligten Enzyme sind unbekannt, doch es scheint am einfachsten, sich einen Crossing-over-Prozeß wie den in Abbildung 18-8 skizzierten vorzustellen. Sowohl die sehr geringe Transformationseffizienz als auch die geringe Größe der Genome sprechen gegen die Verwendung eines oder mehrerer Virus-codierter Enzyme.



**ABBILDUNG 18-8** Eine schematische Zeichnung, die zeigt, wie die zirkulären Polyomachromosomen sich in ein Wirtschromosom integrieren könnten.

#### FREISETZUNG INFEKTIÖSER PARTIKELN NACH DER FUSION EINER TRANSFORMIERTEN NICHTPERMISSIVEN ZELLE MIT EINER NICHTTRANSFORMIERTEN PERMISSIVEN ZELLE

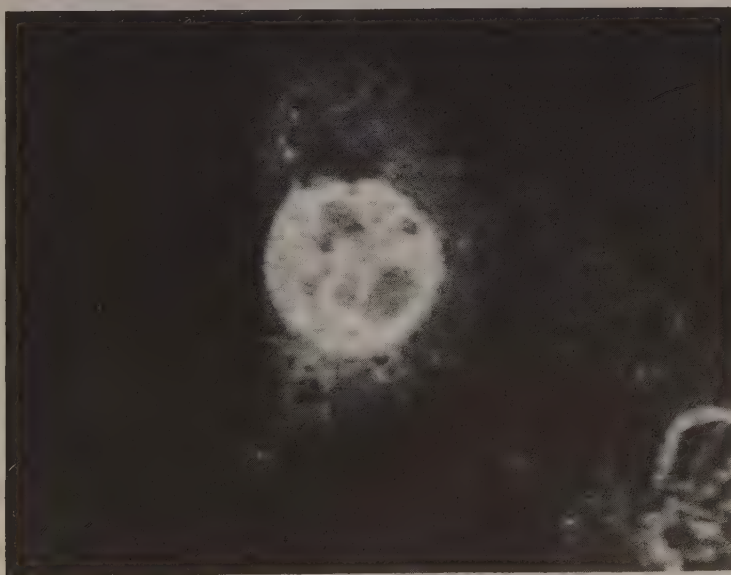
Viele Jahre hindurch versuchte man, Polyoma (SV40) Tumorzellen dazu zu bringen, infektiöse Viruspartikeln zu machen. Aber selbst bei Anwendung der Methoden, die zur Freisetzung des  $\lambda$ -Prophagen aus dem *E. coli*-Chromo-



som führen, waren alle derartigen Versuche erfolglos. Vor ganz kurzer Zeit jedoch fand man, daß die Methode der Zellverschmelzung funktionierte. Wenn eine SV40-transformierte 3T3-Zelle mit einer nichttransformierten Zelle, die für SV40 permissiv ist, verschmolzen wird, bringen die fusionierten Zellen fast immer innerhalb von 24 Stunden SV40-Nachkommenschaft hervor. Irgendetwas in der permissiven Zelle erlaubt es den SV40-Genen, sich von einem Wirtschromosom zu trennen und einen vollständigen Vermehrungszyklus zu durchlaufen. Bis jetzt konnte dieses Ergebnis noch nicht mit Polyoma-transformierten Zellen wiederholt werden, aber höchstwahrscheinlich ist der Grund dafür trivial, nicht grundlegend. Man nimmt an, daß bei Polyoma ebenso wie bei SV40 das gesamte Virusgenom, nicht nur ein Teil davon, in den transformierten Zellen vorliegt.

#### VIRUS-SPEZIFISCHE mRNA IN TRANSFORMIERTEN ZELLEN

Nur ein Bruchteil der Polyoma (SV40)-Genome ist in transformierten Zellen aktiv. Die aktiven Gene gehören größtenteils, wenn nicht gänzlich, zur Klasse der frühen Gene; das sind dieselben Gene, die sofort wirksam werden,



**ABBILDUNG 18-9** Beweis der Anwesenheit des SV40-spezifischen Kernantigens innerhalb nicht-permissiver Hamsterzellen, die durch SV40 transformiert wurden, mit Hilfe fluoreszierender Antikörper (Freundlicherweise von V. Defendie, Wistar Institute, Philadelphia, zur Verfügung gestellt).

nachdem Polyomapartikeln die nichtpermissiven Zellen infiziert haben. Späte Gene sind entweder überhaupt nicht aktiv, oder in so geringem Maß, daß es bis jetzt unentdeckt blieb. Eins der frühen Gene, das in transformierten Zellen aktiv ist, erzeugt das Tumor-spezifische nukleare Antigen (Abbildung 18-9). Es gibt auch Hinweise für die Wirkung eines anderen frühen Gens, das ein Oberflächenantigen (das Transplantationsantigen) codiert, welches in der Zelloberfläche lokalisiert ist. Es kann dadurch nachgewiesen werden, daß sich Polyoma-Tumorzellen nicht teilen, wenn sie in Inzuchtmäuse transplantiert werden, die noch keinen Kontakt mit Polyoma hatten.

Die Anwesenheit von Tumor-spezifischen zellulären Antigenen erklärt, warum Polyoma, SV40 und viele andere Tumoviren für gewöhnlich nur in neugeborenen Tieren Tumoren hervorrufen. Zum Zeitpunkt der Geburt können die meisten Säugetiere kaum zirkulierende Antikörper erzeugen. Tumorzellen, die bei der Geburt entstehen, werden nicht durch neu hergestellte Tumor-spezifische Antikörper gegen Polyoma zerstört. Tatsächlich führt die Gegenwart von Tumorzellen oft zu immunologischer Toleranz, da das immunologische System des Wirts die Tumorzellen als normale Zellen anerkennt.

#### **ENTHALTEN PERMISSIVE ZELLEN $\sigma$ -FAKTOREN, DIE GEBRAUCHT WERDEN, UM SPÄTE GENE ZU LESEN?**

Die Tatsache, daß die Verschmelzung mit einer permissiven Zelle die transformierten Kerne nichtpermissiver Zellen veranlaßt, SV40 zu produzieren, zeigt, daß, im Gegensatz zum  $\lambda$ -Prophagen, SV40-Genome unter positiver, nicht unter negativer Kontrolle stehen. Im Falle von  $\lambda$  wird das Prophagen-genom durch die Anwesenheit seines Repressors inaktiv gehalten, was die Transkription sowohl der frühen als auch der späten  $\lambda$ -mRNA verhindert. Aber falls die Unfähigkeit, die späten SV40-Genome zu transkribieren, auf einen Repressor zurückzuführen wäre, würde die Verschmelzung mit einer permissiven Zelle nicht unbedingt zu einer Induktion führen. Der Repressor sollte sich weiterhin mit dem Promotor für die späten SV40-Gene verbinden. Statt dessen könnte die permissive Zelle ein Molekül enthalten, das für die späte Transkription notwendig ist; es könnte ein RNA-Polymerase  $\sigma$ -Faktor sein, der normalerweise in nichtpermissiven Zellen fehlt. Diese Hypothese sollte bald überprüfbar werden. Bis jetzt wurde sehr wenig Arbeit darauf verwendet, die RNA-Polymerase aus Säugetierzellen zu charakterisieren, aber dieser Situation wird augenblicklich schnellstens abgeholfen.

## VIRUS-INFIZIERTE ZELLEN NEIGEN DAZU, NUKLEINSÄURE ZU SYNTHETISIEREN

Hier werden wir versuchen, zum Kern des Problems vorzustoßen. Warum sollte eine Vielfalt von DNA-haltigen Viren, viele morphologisch dem Polyoma ähnlich, aber andere wieder von ganz verschiedener Struktur (z.B. gewisse Adenoviren), die Fähigkeit besitzen, in neugeborenen Tieren Tumoren zu erzeugen? Unsere Antwort wird mit der Annahme beginnen, daß die Bildung von Tumoren, die den Wirt töten, im wesentlichen ein Laboratoriumsunfall ist. Außerhalb des Laboratoriums werden Tiere fast niemals mit Polyoma infiziert, bevor sie den beginnenden Tumor immunologisch wirksam bekämpfen können. Wir vermuten weiterhin, daß die antigene Spezifität von Virus-induzierten Tumoren eine notwendige Eigenschaft ist, die in der Natur das Überleben des Wirts und damit auch des Virus selbst sichert. Wenn die hervorgerufenen Tumoren nicht spezifische Antigene enthielten, würden fast alle viralen Infektionen zum Tod des Wirts durch Krebs führen.

Wir werden außerdem versuchsweise die Hypothese vertreten, daß alle transformierten Zellen ein Viruschromosom (Provirus) enthalten, das durch Crossing-over in eins der Wirtschromosomen integriert wurde. Wenn wir annehmen, daß ein Provirus vorhanden ist, können wir fragen, ob uns die Kenntnis irgendeiner der Eigenschaften einer Virus-infizierten Zelle zu einem entscheidenden Einblick in den Metabolismus einer Krebszelle verhelfen könnte.

Gegenwärtig ist unser Wissen über den Metabolismus von Zellen höherer Organismen, die von Viren infiziert wurden, gering, sodaß wir unsere Gedankengänge auf den Erkenntnissen mit Bakterienviren aufbauen müssen. Diese Systeme ließen die sehr wichtige Verallgemeinerung zu, daß Viren dazu neigen, ihr Vermehrungspotential zu maximieren, indem sie die Wirtszelle so verändern, daß Virusnukleinsäure mit äußerster Geschwindigkeit synthetisiert werden kann. In Kapitel 15 beschrieben wir einige Beispiele, in denen die Nukleinsäure des infizierenden Virus Enzyme codiert, die am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt sind. Manchmal sind die beteiligten Enzyme spezifisch für die Virus-infizierte Zelle, aber in anderen Fällen haben die Virus-spezifischen Enzyme dieselben Funktionen wie schon vorhandene Wirtszellenzyme. Zum Beispiel codiert der Phage T2 ein der *E. coli*-DNA-Polymerase ähnliches Enzym, das einer infizierten Zelle eine viel schnellere DNA-Synthese ermöglicht als einer nichtinfizierten.

Es ist wahrscheinlich, daß außer Phagen auch viele andere Viren ebenso aktiv eine rasche Synthese der Virusnukleinsäure bewirken können. Dies könnte bei Viren, die Organismen mit einem großen Anteil sich nicht teilender Zellen befallen, sogar noch ausgeprägter sein, da viele ruhende Zellen (z.B. Leberzellen) einen Mangel von Enzymen aufweisen, die bei der Herstellung

von Vorstufen der Desoxynukleosidtriphosphate beteiligt sind. Wenn ein Animalvirus in solch eine Zelle eindringt, muß es entweder alle fehlenden Nukleinsäure-synthetisierenden Enzyme codieren oder es muß die Kontrollmechanismen aufheben, die es einer ruhenden Zelle verbieten, diese Enzyme herzustellen. Natürlich dringen Viren sehr oft in Zellen mit ausreichender Stoffwechselaktivität ein. Andererseits ist es wahrscheinlich, daß sie genügend oft in sich nicht teilende Zellen eindringen und dabei jenen Partikeln, die sich in jeder Phase des Zellzyklus vermehren können, entschieden einen entwicklungsgeschichtlichen Vorteil verleihen.

Wie wir schon früher erwähnten, haben sowohl Polyoma als auch SV40 die Eigenschaft, die Synthese von Wirtszell-DNA gleichzeitig mit ihrer eigenen Vermehrung zu induzieren. Diese Fähigkeit geht auf das Produkt eines frühen Gens zurück und so ist es wahrscheinlich, daß es auch in transformierten Zellen ausgedrückt wird, die integrierte Viruschromosomen enthalten. Dies könnte erklären, warum die Synthese von DNA in einem durch DNA-Viren induzierten Tumor nicht den Kontrollmechanismen unterliegt, die in normalen Zellen wirksam sind. Somit ist es eine der vordringlichsten Aufgaben, das Genprodukt zu identifizieren, das für die Induktion der Synthese von Wirtszell-DNA verantwortlich ist. Da es so wenige frühe Gene gibt, ist die Chance groß, daß das nukleäre Polyoma-Antigen tatsächlich das Protein darstellt, das die DNA-Synthese auslöst. Man bemüht sich daher gegenwärtig sehr, das Kernantigen in reiner Form zu isolieren.

Unverstanden bliebe noch immer, welchen Vorteil es dem Tumovirus bietet, sich als Provirus in das Wirtszellschromosom einzufügen. Es scheint kaum glaublich, daß die Insertion eine Zufallsangelegenheit ist, da sie zwischen Bereichen der Viruschromosomen und der Wirtszellchromosomen Homologien in der Nukleotidsequenz voraussetzt. Unser gegenwärtiges Unvermögen, dieses Rätsel zu lösen, sollte man jedoch im Zusammenhang mit einem ähnlichen Mangel an Verständnis der bakteriellen Lysogenie sehen. Hier sind wir ebenfalls bis jetzt nicht in der Lage, irgendeinen selektiven Vorteil für das Stadium des Prophagen zu sehen.

## VIRUS-INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN AN DER ZELLOBERFLÄCHE

Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß allein die Induktion der DNA-Synthese der SV40 (Polyoma)-transformierten Zelle alle wesentlichen Eigenschaften einer Krebszelle verleiht. Genauso wichtig, wenn nicht sogar noch wichtiger, sind spezifische chemische Veränderungen an der Zelloberfläche, die zum Verlust der Kontaktinhibition führen. Diese Veränderungen, die erstmalig durch immunologische Methoden entdeckt wurden, sind jetzt durch die selektive Agglutination transformierter Zellen durch ein Glykoprotein aus

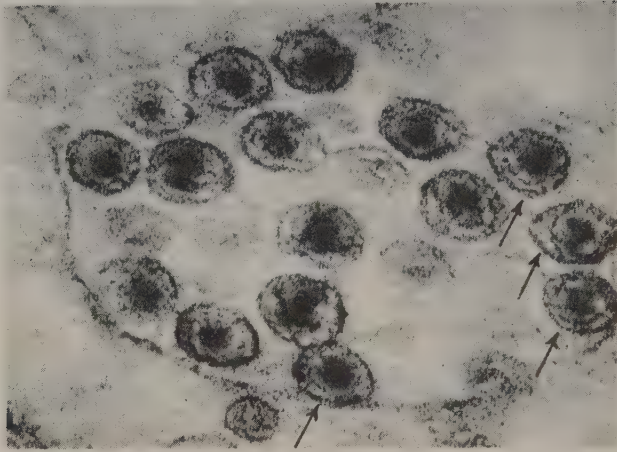


Weizenkeimen leicht zu verfolgen. Derzeit gibt es Anhaltspunkte dafür, daß die Virus-induzierten spezifischen Veränderungen an der Zelloberfläche in direkter Beziehung zur Replikation der viralen DNA stehen. Der Hinweis darauf kommt von einer Polyomamutante, die bei hoher Temperatur die Fähigkeit zur viralen DNA-Synthese spezifisch verliert. Noch wichtiger ist, daß transformierte Zellen bei hoher Temperatur gleichzeitig ihre Fähigkeit verlieren, durch das spezifische Glykoprotein agglutiniert zu werden. Derzeit hat noch niemand eine glaubhafte Hypothese aufgestellt, die erklärt, warum eine Veränderung der Zelloberfläche zu DNA-Synthese führen sollte (oder umgekehrt), noch gibt es einen offensichtlichen Grund dafür, warum die Virusreplikation durch spezifische Membranveränderungen gefördert werden sollte.

#### **DAS ROUS-SARKOM WIRD DURCH EIN MYXOÄHNLICHES VIRUS VERURSACHT**

Spezifische Veränderungen der Membran von Zellen, die mit verschiedenen RNA-Tumoviren infiziert werden, lassen sich viel leichter mit der Vermehrungsweise solcher Viren in Verbindung bringen. Das am besten bekannte RNA-Tumovirus ist das Rous-Sarkomvirus (RSV). Obwohl es vor mehr als fünfzig Jahren entdeckt wurde, erlaubte unsere geringe Kenntnis der Virusvermehrung bis vor fünfzehn Jahren keine entscheidenden Versuche mit RSV. RSV ist ein mittelgroßes Virus, das morphologisch einer großen Gruppe von Animalviren ähnlich ist, die zusammen *Myxoviren* genannt werden. Dies sind Viren, die wesentlich komplizierter als die der Polyoma-SV40-Gruppe sind. Im Zentrum jedes Myxovirus liegt eine *einsträngige RNA-Kette*, die ähnlich wie beim Tabakmosaikvirus, von vielen Proteinuntereinheiten (den sogenannten internen Proteinen) umgeben ist. Der RNA-Protein-Komplex ist nicht starr, wie bei TMV, sondern flexibel und wird von einer speziellen äußeren Membran umgeben, die aus Protein und Lipid zusammengesetzt ist (Abbildung 18-10). Die Anwesenheit des Lipids verleiht dem Myxovirus die Eigenschaft, durch Lipidlösungsmittel schnell zerstört zu werden. Zu den bekanntesten Myxoviren gehören die Gruppen, die Grippe (Influenza) und Mumps hervorrufen.

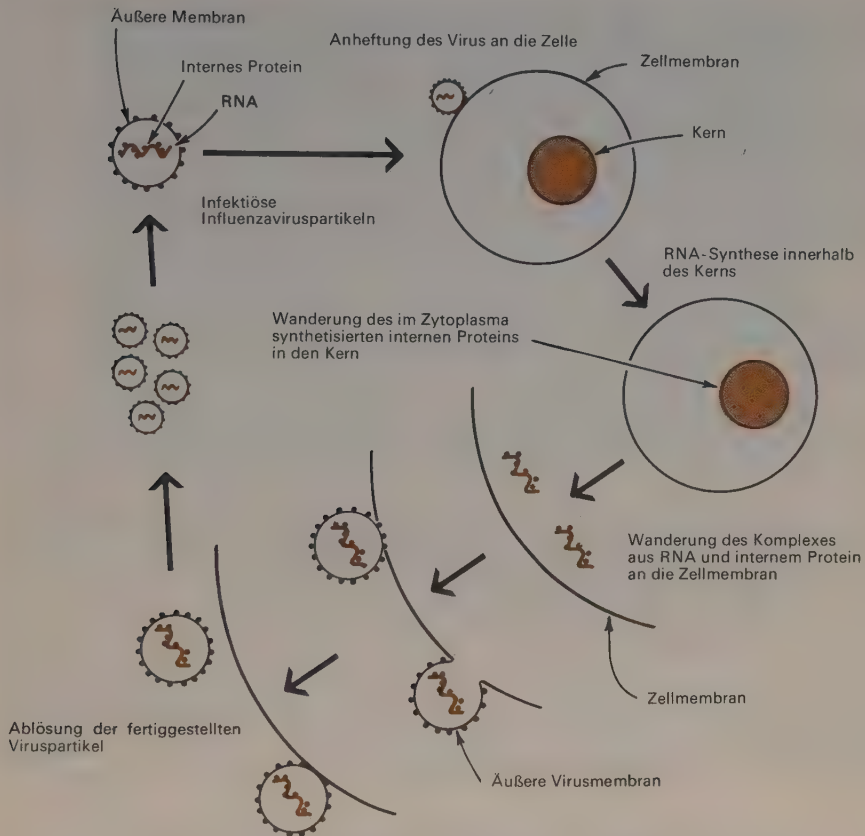
Es scheint, daß es bei Myxoviren beträchtliche Größenunterschiede gibt. Der äußere Durchmesser einiger Myxoviren beträgt nur 700 Å (z.B. Influenza), bei anderen dagegen (z.B. Mumps) ungefähr 1200 Å. Ebenso bestehen große Unterschiede in der Menge von Nukleinsäure pro Partikel; sie reicht von  $MG = 2 \times 10^6$  bis zu  $10^7$ . Die Analyse der Nukleotidbasen zeigt nichtkomplementäre Basenverhältnisse, was auf eine einsträngige Struktur hinweist.



**ABBILDUNG 18-10** Elektronenmikroskopische Aufnahme (von W. Bernhard, Institut du Cancer, Villejuif, Frankreich) eines Ultradiünnschnittes einer Hühnerzelle, die mit RSV und einem Helfervirus infiziert wurde. Die Viruspartikeln erscheinen als zirkuläre Körper mit einem Durchmesser von ungefähr 750 Å. [Wiedergabe von Bull. Cancer, **43**, 497 (1956), mit Genehmigung.]

### MYXOVIREN REIFEN AUF ZELLOBERFLÄCHEN

Nach dem Eindringen in die Zelle wandern die RNA-Ketten vieler Myxoviren in den Zellkern. Dort häufen sich neusynthetisierte RNA-Ketten und spezifische interne Proteine an. Komplexe aus RNA und internem Protein wandern dann an die Zelloberfläche, wo sie von den Lipid- und Proteinkomponenten umgeben werden, die die äußere Virusmembran ausmachen. Die neu gebildeten Viruspartikeln scheinen sich von der Zelloberfläche abzuschneiden, wobei sie möglicherweise einige normale Zellkomponenten aufnehmen (Abbildung 18-11). Eine charakteristische Eigenheit einer Myxovirus-Infektion besteht darin, daß eine beträchtliche Virusvermehrung und Freisetzung stattfinden kann, ohne den Tod der Zelle zu verursachen. Obwohl die Replikation vieler Myxoviren (z.B. Influenza) schließlich zum Tod der Zelle führt, wie wir bald im Fall des RSV zeigen werden, ist der Tod der Zelle absolut keine notwendige Folge der großen Produktion myxoähnlicher Viren durch die Zelle.



**ABBILDUNG 18-11** Schematische Darstellung des Vermehrungszyklus eines typischen Myxovirus (Influenzavirus).

### GENOME VON RNA-TUMORVIREN SIND RELATIV GROSS UND CODIEREN UNGEFÄHR 30-50 VERSCHIEDENE PROTEINE

Kürzlich vorgenommene Messungen von RSV weisen darauf hin, daß jede Partikel eine RNA von einem MG von ungefähr  $10^7$  enthält. Die genetische Information von RSV (30.000 Nukleotide) ist daher ungefähr sechs mal so groß wie die von Polyoma (4800 Basenpaare). Ungefähr 10.000 Aminosäuren werden durch das RSV Genom codiert. Diese Anzahl genügt für etwa 30-50 verschiedene Proteine, viel mehr als in seiner Hülle anzutreffen sind. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß während der RSV-Vermehrung

eine große Anzahl von noch nicht identifizierten Proteinen synthetisiert wird.

Eine ähnliche genetische Vielfalt besitzen auch mehrere andere Tumoren, die RNA als genetisches Material verwenden. Einige Krebsviren von Mäusen, die Leukämie verursachen (z.B. Rauschervirus, Maloneyvirus und Grossvirus) ebenso wie einige Hühner-Leukämieviren sind morphologisch mit dem Rousvirus identisch; sie alle haben RNA-Ketten mit MG von ungefähr  $10^7$ .

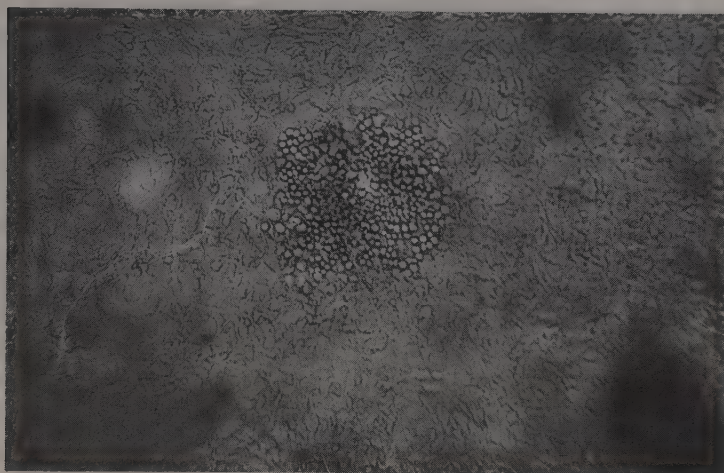
### **INFEKTION DURCH EINE EINZIGE RSV-PARTIKEL FÜHRT ZU EINER KREBSZELLE**

Die Infektion einer empfänglichen Hühnerzelle durch eine *einzige* RSV-Partikel wandelt die normale Zelle fast sofort in eine Krebszelle um. Innerhalb von 48 Stunden nach der Anheftung des Virus verliert die Zelle ihre normale Form, sie rundet sich ab und erhält die Fähigkeit zur Invasion, charakteristisch für eine Tumorzelle. Diese rasche Reaktion kann man leicht in Gewebekulturzellen von Hühnerembryonen demonstrieren. Gibt man RSV-Partikeln zu normalen Zellen zu, die an einer Glasoberfläche wachsen, kann man die transformierten Zellen leicht zählen. Sie sind der Kontaktinhibition nicht unterworfen und hören daher nicht zu wachsen auf, sobald die Glasoberfläche mit Zellen bedeckt ist, sondern sie vermehren sich weiterhin und häufen sich übereinander unter Bildung distinkter Massen, die von normalen Zellen leicht zu unterscheiden sind (Abbildung 18-12).

### **RSV-TRANSFORMIERTE ZELLEN PRODUZIEREN OFT ANDERE ROUS-ÄHNLICHE VIREN**

Ursprünglich nahm jeder an, daß RSV-infizierte Zellen dieses Virus und kein anderes enthielten. Heute weiß man jedoch, daß viele transformierte Hühnerzellen gleichzeitig mit einem anderen, sehr ähnlichen Virus, z.B. dem morphologisch identischen RAV (Rous Associated Virus) infiziert sind, und daß solche Zellen beide Viren gleichzeitig produzieren. Am wichtigsten ist dabei, daß die Anwesenheit von RAV die Struktur der RSV-Nachkommenschaft entscheidend beeinflusst. Ist eine Hühnerzelle allein mit RSV infiziert, werden Nachkommenschaftspartikeln aus der Zelloberfläche durch Knospung («budding») freigesetzt, aber ihre äußeren Membranen sind irgendwie schadhaft und können sich an die meisten anderen Hühnerzellen nicht adsorbieren. Wenn sich hingegen RAV gleichzeitig in derselben Zelle vermehrt, wird ein Teil der RSV-Genome der Nachkommenschaft von äußeren





**ABBILDUNG 18-12** Aufnahme einer Gruppe (Fokus) von Hühnerzellen (Vergrößerung  $\times 30$ ), die durch RSV-Infektion transformiert wurde (von H. Rubin, Department of Molecular Biology, University of California, Berkeley zur Verfügung gestellt). Die sphärischen, transformierten Zellen sind leicht vom Hintergrund normaler Zellen zu unterscheiden.

Membranen umgeben, die RAV-spezifische Komponenten enthalten und sie können sich daher leicht in Hühnerzellen vermehren. Die Vermehrung von RAV unterstützt somit die Produktion von infektiösen RSV-Partikeln und deshalb wird RAV häufig als *Helfervirus* bezeichnet.

#### HELFERVIREN KÖNNEN SELBST EBENFALLS KREBS VERURSACHEN

RAV selbst ist ein Krebs-(Leukose) Virus, das heißt, wenn es in ein Huhn injiziert wird, kann es eine Leukämie verursachen. Die Infektion, wie die mit anderen Leukämieviren, transformiert jedoch die Wirtszelle üblicherweise nicht zu einer malignen Zelle. Infizierte Zellen behalten für gewöhnlich ihre normale Morphologie, bis auf die ständige Produktion großer Zahlen neuer Viruspartikeln an ihren äußeren Zellmembranen. Warum die Zelltransformation durch Leukämieviren ein seltener Vorgang ist, ist noch vollkommen unbekannt. Die Antwort könnte sein, daß nur eine sehr spezielle Klasse defekter Partikeln transformieren kann. Wenn das der Fall ist, wären sie wegen gleichzeitiger Anwesenheit sehr vieler normaler Leukosegenome nur schwer zu entdecken. Bis jetzt wurde trotz einiger Bemühung kein Beweis für die Beteiligung von Helferviren bei irgendeinem bekannten Leukämievirus

gefunden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Resultaten, die man mit Viren erhielt, die verschiedene Sarkome (solide Tumoren) erzeugen. Sowohl in Hühnern als auch in Mäusen sind Sarkomviren häufig mit Helfer-viren assoziiert. Die Arbeit an diesem Problem steckt eindeutig noch in den Kinderschuhen.

Ein defektes Virusgenom *per se* könnte daher eine besondere Eigenheit der Sarkom-erregenden Viren sein und wäre dann nicht allgemein für die meisten anderen RNA-Tumoviren zutreffend; die grundlegende karzinogene Eigenschaft von RNA-Tumoviren könnte statt dessen auf die Art ihrer Ausreifung an der Zelloberfläche zurückgehen. Eines oder mehrere der Proteine, die für den Bau der äußeren Membran der RNA-Tumoviren verwendet werden, könnten irgendwie die normale Zellmembran stören und dabei Kontaktinhibition und die Regulation der DNA-Replikation verhindern.

#### DNA ALS DIE PROVIRUS-FORM VON RNA-TUMORVIREN

RSV-transformierte Zellen kehren fast nie in ihren normalen Zustand zurück. Die Zahl der RSV-Genome muß daher entweder sehr groß sein oder die, die vorhanden sind, müssen in der Zelle so fest verankert sein, daß sie bei der Mitose regelmäßig an beide Tochterzellen weitergegeben werden. Anfangs schien es am wahrscheinlichsten, daß RSV seine RNA wie ein RNA-Phage über doppelhelikale RNA-Moleküle als Zwischenstufe repliziert. Wenn dies der Mechanismus wäre, dann müßten die Kerne aller transformierten Zellen eine große Anzahl doppelhelikaler Zwischenstufen enthalten. Viele überschüssige Kopien würden gebraucht werden, um sicherzustellen, daß eine willkürliche Trennung während der Mitose nicht gelegentlich zu einer Zelle führt, der ein RSV-Genom fehlt. Aber eine intensive Suche nach solchen doppelhelikalen Molekülen hatte absolut negative Resultate.

Neueste Daten legen statt dessen die Vermutung sehr nahe, daß das RSV-Genom, wie das SV40-Genom, Teil eines der Wirtschromosomen (ein Provirusstadium) wird, wenn es eine Zelle transformiert. Es kann sich dann replizieren, als ob es eine Serie von Wirtsgenen wäre. Dafür gibt es mehrere Beweise. Erstens verhindern Inhibitoren der DNA-Synthese, daß RSV die Zellen transformiert. Diese Tatsache weist darauf hin, daß das RSV-Genom - nach seinem Eintritt in den Zellkern des Wirts - als Matrize verwendet wird, um einen komplementären DNA-Strang zu bilden. Zweitens enthält DNA, die aus RSV infizierten Zellen isoliert wurde, einen kleinen Bereich, in dem eine der Ketten in ihrer Sequenz der RSV-RNA komplementär ist. Im Gegensatz dazu ist bei nicht infizierten Zellen keine Homologie zu sehen. Drittens wurde, was noch wichtiger ist, vor ganz kurzer Zeit aus reifen RSV-Partikeln ein Enzym isoliert (1970), das den Kopierprozeß von

RNA  $\rightarrow$  DNA ausführt. Indem es ein RSV-RNA-Molekül als Matrize verwendet, kann dieses Enzym Desoxynukleosidtriphosphate verknüpfen und so eine einsträngige DNA-Kette bilden. Ob eine neu hergestellte DNA-Kette als Matrize für einen komplementären DNA-Strang dient, bevor sie mit einem Wirtschromosom rekombiniert, muß noch erforscht werden. Am aufregendsten ist, daß ähnliche Enzyme aus verschiedenen anderen RNA-Tumoren, einschließlich des Rauscher-Mäusevirus und einem Hühner Leukosevirus, isoliert werden können.

Das integrierte RSV-Genom stellt Tochtermoleküle von RSV-RNA durch den gleichen Mechanismus her, der zur Transkription von Wirtsgenen verwendet wird.

Daher verhindert das Antibiotikum Actinomycin D, das sich spezifisch an DNA bindet und dabei die DNA-abhängige RNA-Synthese verhindert, daß transformierte Zellen Nachkommenschaftspartikeln herstellen. Im Gegensatz dazu hat Actinomycin keine Wirkung auf die Vermehrung vieler RNA-Viren (z.B. Poliomyelitis), deren Replikation eine doppelhelikale RNA-Zwischenstufe erfordert.

Das Konzept eines DNA-Provirus für ein RNA-Virus ist natürlich ein radikaler Vorschlag. Es zerstört den Glauben, daß die Strömung der genetischen Information immer in der Richtung von DNA zu RNA geht und nie von RNA zu DNA. Andererseits bietet es Zellen eine noch größere Vielfalt von Möglichkeiten, genetische Information auszutauschen. Wenn man die ungeheure Komplexität biologischer Systeme betrachtet, wäre es nicht überraschend, wenn dieser Mechanismus in manchen Situationen von einzigartigem Vorteil wäre.

## **DAS BURKITT-LYMPHOM UND SEINE BEZIEHUNG ZUR MONONUKLEOSE**

Trotz der vielen Fortschritte im Verständnis der viralen Krebserzeugung in verschiedenen Tierspezies, besteht bis jetzt noch keine eindeutige Verbindung zwischen einer menschlichen Krebserkrankung und einem spezifischen Virus. Alle bis jetzt gesammelten Beweise sind indirekt. Eine der vielversprechendsten Fährten betrifft ein Lymphom, das erstmals von dem englischen Chirurgen Burkitt in Uganda beobachtet wurde. Sein Vorkommen schien auf bestimmte ökologische Zonen beschränkt, was andeutete, daß es durch einen Insektenvektor übertragen wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Burkittzellen, die in Gewebekultur wachsen, zeigen gelegentlich Herpes II-Partikeln. Es ist äußerst interessant, daß Antiserum gegen diese DNA-haltigen Viren mit Zellen von Patienten reagiert, die an infektiöser Mononukleose leiden. Bei dieser Krankheit kommt es zu einer sehr starken Vermehrung von lymphatischen Zellen zu tumorartigen Massen, die sich



später wieder zurückbilden, sehr wahrscheinlich aufgrund einer immunologischen Reaktion. Daher ist es sehr verlockend, die Hypothese aufzustellen, daß die Vermehrung der Burkittzellen durch ein Herpes II-ähnliches Virus stimuliert wird, aber daß aus irgendeinem unbekannten Grund die Rückbildung viel weniger wahrscheinlich ist als bei der Mononukleose.

## HERPES II-VIREN UND CERVIXKARZINOM

Es gibt auch indirekte Beweise, die ein anderes Virus vom Typ Herpes II mit dem menschlichen Cervixkarzinom verbinden. Patienten, die an dieser Krankheit leiden, haben mit sehr großer Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen derartige Viren, während Kontrollseren solche Antikörper viel weniger häufig enthalten. Wie im Fall vom Burkitt-Lymphom zeigen die Tumorzellen keine Anzeichen viraler Infektion. Dies deutet an, daß das beteiligte Herpes II-Virus als Karzinogen wirkt, wenn es im Zustand eines Provirus vorliegt. Interessanterweise nimmt man allgemein an, daß die Herpes II-Viren, die für Fieberblasen bei Erkältungen verantwortlich sind, zwischen den infektiösen Perioden, die durch große Mengen von Nachkommenschaftspartikeln charakterisiert sind, in latenter Zustand (z.B. Provirus) vorliegen. Aber bis jetzt gibt es noch keine sicheren Beweise, die diese Vermutungen unterstützen. Man hat jedoch den Eindruck, daß viele andere DNA-Viren dem SV40 in seiner Fähigkeit, während langer Zwischenperioden im Wirtschromosom zu verbleiben, ähnlich sind.

## DIE SUCHE NACH RNA-TUMORVIREN BEIM MENSCHEN

Gegenwärtig werden sehr große Anstrengungen unternommen, um zu beweisen, daß einige Tumoren im Menschen durch RNA-Viren hervorgerufen werden, die dem RSV morphologisch ähnlich sind. Die Aufmerksamkeit konzentrierte sich besonders auf jene spezifischen Tumoren, bei denen in tierischen Systemen Viren eindeutig beteiligt sind. Tausende sich unabhängig entwickelnder Tumoren wurden bereits elektronenmikroskopisch untersucht, um festzustellen, ob RSV-artige Partikeln vorhanden sind. Gelegentlich zeigen einige Zellen eines bestimmten Tumors Virus-artige Partikeln, aber man findet sie auch (wenn auch viel seltener) in offensichtlich normalen Zellen. Deshalb richtet sich die Aufmerksamkeit auf die Isolierung solcher Partikeln, um zu sehen, ob sie sich nicht nur wie Viren vermehren, sondern, was noch wichtiger ist, ob sie auch Zelltransformation hervorrufen können. Gerade in letzter Zeit erzielte man positive Resultate mit mehreren Tumoren, die Partikeln hervorbringen, welche sich in normalen menschlichen Gewe-



bekulturzellen vermehren können. Es gibt bis jetzt jedoch keine Beweise, daß diese Viren normale Zellen in Krebszellen transformieren können und die Möglichkeit besteht, daß sie überhaupt erst nach dem Entstehen des Tumors einwanderten.

### THEORIE DES RNA-ONKOGENS

Viele Virologen überrascht derzeit eher, daß man reife Viren aus den meisten menschlichen Tumoren, von denen man annimmt, daß sie durch RNA-Viren hervorgerufen werden (z.B. die verschiedenen Formen der Leukämie), nicht isolieren kann, als die gelegentliche Anwesenheit von Virus-artigen Partikeln in einem geringeren Bruchteil der untersuchten Tumoren. Dennoch glauben diese Wissenschaftler fest an die Beteiligung von RNA-Viren und stellen die Hypothese auf, daß die meisten dieser Krebserkrankungen durch defekte RNA-Viren hervorgerufen werden, die praktisch ein ständiger Bestandteil (Onkogen) des menschlichen Chromosoms geworden sind. Nach dieser Hypothese führt die Funktion dieser Onkogene zur Produktion der spezifischen Proteine (Enzyme), die den Wirtszellen ihren krebsartigen Zustand verleihen. Nur wenn solche Tumorzellen gleichzeitig mit Helferviren infiziert werden, können ihre Onkogene gelegentlich in reifen Viruspartikeln eingepackt werden und dadurch die virale Ursache des krebsartigen Zustands offenbaren.

Eine Variante dieser Theorie schlägt vor, daß viele Onkogene in einer ruhenden Form vorhanden sind und im allgemeinen nur durch die Wirkung externer Karzinogene, wie ionisierende Strahlung, Zigarettenrauch oder vielleicht die Gegenwart eines anderen Virus zur Funktion (z.B. Transkription) angeregt werden. Die Tatsache, daß gewisse Mäuseleukämien, die durch Röntgenstrahlung induziert wurden, oft Viren enthalten, die Leukämie sogar in Abwesenheit von irgendwelcher Bestrahlungsbehandlung hervorrufen, unterstützt diese Idee. Dies deutet darauf hin, daß die primäre Wirkung der Röntgenstrahlen darin besteht, die Funktion eines Leukämievirus-Genoms zu induzieren, das im Wirtschromosom schon anwesend ist. Gegenwärtig kommt man um die Vorstellung kaum herum, daß die Genome vieler solcher Viren normalerweise in den meisten Zellen vorhanden sind und oft durch die Keimzellen von den Eltern auf die Nachkommenschaft übertragen werden, ohne entdeckt zu werden.

### DNA-TUMORVIREN WIRKEN HÖCHSTWAHRSCHEINLICH DIREKT

Eine Extremform der Onkogenhypothese schlägt vor, daß alle DNA-Viren dadurch wirken, daß sie die Funktion von RNA-Onkogenen induzieren,

wonach die Genome des DNA-Virus gar nicht mehr länger anwesend zu sein brauchen. Diese Hypothese ist jedoch mit einigen neuen Experimenten unvereinbar, in denen Zellen, die durch eine temperaturempfindliche Polyomamutante transformiert wurden, bei hohen Temperaturen die Morphologie einer Krebszelle verlieren sowie die Fähigkeit, durch das spezifische Glykoprotein agglutiniert zu werden. Das zeigt, daß ein Proteinprodukt (das in der temperaturempfindlichen Mutante bei hohen Temperaturen inaktiv ist) immer anwesend sein muß, damit die transformierte Zelle eine Krebszelle bleibt. Wenn daher diese anscheinend normalen Zellen auf eine niedrigere Temperatur zurückgebracht werden, um sich zu vermehren, erwerben sie bald wieder die Morphologie der Krebszelle. Wenn das Polyomagenom nur die Funktion eines RNA-Onkogens induzierte, braucht man nicht erwarten, daß die fortdauernde Anwesenheit des DNA-Virusgenoms für die Aufrechterhaltung des kanzerösen Zustandes erforderlich wäre.

## UNTERSUCHUNGEN VON KREBS AUF MOLEKULARER EBENE

Bis zu den jüngsten Arbeiten mit Polyoma und RSV ähnelte die Suche nach chemischen Unterschieden zwischen normalen und Krebszellen der Suche nach einer Stecknadel im Heu. In der Zelle eines Säugetieres dürfte es mehr als hunderttausend verschiedene Gene geben, von denen wir derzeit vielleicht 1000 eine Funktion zuschreiben können. Daher suchten Biochemiker bei der Krebsforschung früher am häufigsten nach Veränderungen in Molekülen, die noch nicht entdeckt worden waren. Diese Situation konnte nur solange andauern, wie die Forschung von dem Konzept der somatischen Mutation beherrscht war.

Die zunehmende Verwendung von Viren als Karzinogene hat die Lage weitgehend verändert. Jetzt können wir fragen, wie ein wesentlicher Aspekt der Virusvermehrung in Richtung Krebserregung fehlgesteuert werden kann. Man kann sich dabei auf die Tatsache konzentrieren, daß einige der wirksamsten Tumoviren nur einige Gene enthalten. Das Hauptziel ist es deshalb, jedem dieser Gene während der Virusvermehrung Funktionen zuzuschreiben. Insbesondere hoffen wir, das Polyoma (SV40)-spezifische Protein (Enzym?) zu finden, das gleichzeitig die normale Kontrolle der DNA-Replikation aufhebt und die äußere Zellmembran verändert. Im Fall des RSV hoffen wir, Einzelheiten darüber zu erhalten, wie sich die reifen Viruspartikeln auf der Zelloberfläche bilden und wie Virusproteine, die durch Virusgenome erzeugt werden, die Kontaktinhibition stören. Natürlich dürfen wir die vor uns liegenden Schwierigkeiten nicht unterschätzen. Diese Viren vermehren sich in Zellen, die wir auf molekularer Ebene erst jetzt zu erforschen beginnen.

Dennoch ist die Tatsache von größter Bedeutung, daß man an die Biochemie des Krebses endlich in direkter, rationaler Weise herangehen kann.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Eine Krebszelle ist eine Zelle, die die Fähigkeit, ihr Wachstum und ihre Teilung zu kontrollieren verloren hat. Wenn sie zur Krebszelle wird, teilt sie sich, wann und wo sie das nicht sollte. Viele Krebszellen haben eine Oberflächenkomponente verloren, die die Zellarten, mit denen sie sich verbinden können, beschränkt (Verlust der «selektiven Klebrigkeit»). Möglicherweise verbunden mit dem Verschwinden der selektiven Klebrigkeit ist ein paralleler Verlust der «Kontaktinhibition» [Hemmung der Zellbewegung (und Teilung?)].*

*Gegenwärtig werden häufig Gewebekulturtechniken in der Krebsforschung verwendet. Eine einzelne Krebszelle kann isoliert werden und die Eigenschaften ihrer gesamten Nachkommenschaft können beobachtet werden, wenn sie sich in vitro vermehrt. Die Methode ermöglicht einen klaren Beweis dafür, daß die Transformation einer normalen Zelle zu einem krebsartigen Stadium eine bleibende Veränderung ist; alle krebsartigen Eigenschaften werden an die Nachkommen einer Krebszelle weitergegeben. Es bestehen drei hauptsächliche Hypothesen über die Ursache des Krebses beim Menschen. Eine sagt, daß er auf die Akkumulation somatischer Mutationen zurückzuführen sei. Eine andere Hypothese schreibt das Auftreten vieler Krebserkrankungen Viren zu. Die Entdeckung vieler verschiedener Viren bei Wirbeltieren, die normale Zellen in Krebszellen transformieren, unterstützt diese Hypothese. Die dritte Hypothese sagt, daß die Transformation in eine Krebszelle ein Beispiel für eine irreversible Differenzierung ist.*

*Untersuchungen der Biochemie der Krebszelle leiden oft unter der Tatsache, daß die ursprüngliche normale Zelle für Vergleiche fehlt. Man würde Systeme brauchen, in welchen die Beigabe eines äußeren Agens (Karzinogen) gut definierte normale Zellen schnell in Krebszellen transformiert. Zu den nützlichsten Karzinogenen, die derzeit bekannt sind, gehören einige Viren. Eines ist Polyoma, ein DNA-Virus, das sich in Mäusen vermehrt; ein anderes ist SV40, ein DNA-Virus, das dem Polyoma sehr ähnlich ist und das sich in Affen vermehrt; ein weiteres ist das Rous-Sarkomvirus, ein RNA-Virus, das in Hühnern solide Tumoren hervorruft.*

*Polyoma und SV40 haben Molekulargewichte von ungefähr 25 Millionen und enthalten einzelne zirkuläre DNA-Moleküle von einem Molekulargewicht von ungefähr 3 Millionen. Dies entspricht einer Menge von DNA, die genügt, um ungefähr 6 bis 8 Gene durchschnittlicher Größe zu codieren. Die Wachstumszyklen der beiden Viren unterteilen sich in frühe und späte Phasen. In der frühen Phase werden mehrere Virus-spezifische Proteine hergestellt, die den*

Weg für die im zweiten Stadium stattfindende Synthese von Tochter-DNA-Molekülen und von strukturellen Proteinen vorbereiten, die in den infektiösen Viruspartikeln vorhanden sind. Dementsprechend gibt es frühe und späte mRNA-Moleküle.

Eine Polyoma (SV40)-Partikel, die eine empfängliche (permissive) Zelle infiziert, vermehrt sich lytisch. Im Gegensatz dazu führt die Infektion einer nichtpermissiven Zelle zu einer abortiven Infektion, in der nur frühe Polyoma-mRNA und Proteinmoleküle hergestellt werden. Ein sehr kleiner Bruchteil abortiver Infektionen führt zur Transformation der Wirtszelle in eine Krebszelle. Die Transformation wird durch die Integration eines intakten viralen Genoms (Provirus) in Wirtschromosomen gekennzeichnet. Im Stadium des Provirus wirken einige Polyoma (SV40)-Gene, von denen eines das spezifische nukleäre Tumorantigen kontrolliert. Die Verschmelzung einer durch SV40 transformierten Zelle mit einer nicht transformierten permissiven Zelle induziert im transformierten Kern die Synthese von SV40-Nachkommenschaft. Das deutet darauf hin, daß permissive Zellen Moleküle enthalten, die für die Ablesung «später» Gene notwendig sind.

Das Rous-Sarkomvirus (RSV) ist ein myxoähnliches Virus, das normale Hühnerzellen rasch in Krebszellen transformiert. Das Wachstum dieses Virus tötet seine Wirtszelle nicht, wenn die viralen Partikeln von der Zelloberfläche, dem Ort ihres schließlichen Zusammenbaus, freigesetzt werden. Rouspartikeln, die in Hühnern gewachsen sind, erzeugen oft Partikeln, die in Hühnern nicht wachsen können. Ob diese besondere Art, defekt zu sein, mit ihren krebserregenden Eigenschaften zusammenhängt, ist nicht bekannt. Es ist verlockend, die Transformation in eine Krebszelle mit dem Auftreten von Hüllproteinmolekülen in Zusammenhang zu bringen, die die Zellmembran stören und dabei die Kontaktinhibition blockieren.

## LITERATUR

- Huxley, J., *Biological Aspects of Cancer*, Harcourt, New York, 1958. Eine kurze Einführung in das Krebsproblem, wie es von einem berühmten Zoologen gesehen wird.
- Burnet, F. M., «Cancer: Biological Approach. I. Processes of Control», *Brit. Med. J.*, **1**, 779 (1957). Eine hervorragende Abschätzung der Komplexität des Krebsgebietes mit besonderer Betonung der Konsequenzen der somatischen Mutation.
- Harris, M., *Cell Culture and Somatic Variation*, Holt, New York, 1964. Eine vollständige Zusammenfassung der modernen Gewebekulturforschung als Grundlage sowohl für die Embryologie als auch die Krebsforschung.
- Gross, L., *Oncogenic Viruses*, Pergamon, New York, 1961. Ein sehr gut belegter Übersichtsartikel über die verschiedenen Viren, die Tumoren verursachen.
- Dulbecco, R., «The Induction of Cancer by Viruses», *Scientific American*, April 1967.



Eine sehr klare Darstellung der gegenwärtigen Vorstellungen, wie die Polyoma- und SV40-Viren Krebs verursachen können.

- Black, P. H., «The Oncogenic Viruses: A Review of *in vitro* Transformation Studies». *Ann. Rev. Microbiol.*, **391** (1968). Die vollständigste moderne Übersicht über viele Aspekte der DNA-Tumoviren.
- Dulbecco, R., «Cell Transformation by Viruses», *Science*, **166**, 962 (1969). Eine sehr moderne Übersicht, in der die molekularbiologische Betrachtung von DNA-Tumoviren im Vordergrund steht.
- Green, M., «Oncogenic Viruses», *Ann. Rev. Biochem.*, **39** (1970). Eine besonders wertvolle Übersicht mit starker Betonung des Problems der Transkription.
- Burger, M. M., und Allan R. Golderg, «Identification of a Tumor-Specific Determinant on Neoplastic Cell Surfaces», *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **57**, 359 (1967). Wie spezifische Glykoproteine mit den Oberflächen von Krebszellen selektiv reagieren.
- Mizutami, S., und H. M. Temin, «An Enzyme in Virions of Rous Sarcoma Virus that appears to Make DNA from an RNA Template», *Nature*, **226**, 1211 (1970).
- Baltimore, D., «An RNA-Dependent DNA polymerase in Virions of RNA Tumor Viruses», *Nature*, **226**, 1209 (1970). Diese und die vorhergehende Arbeit berichten erstmalig über das Virusenzym, das DNA an RNA-Matrizen herstellt.
- Huebner, R. J., und G. J. Todaro, «Oncogenes of RNA Tumor Viruses as Determinants of Cancer», *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **64**, 1087 (1969). Eine kurze Zusammenfassung von Beweisen dafür, daß RNA-Tumovirusgenome in vielen normalen Zellen latent vorhanden sind.

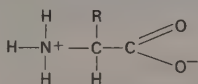
## GLOSSARIUM

- A + T/G + C Verhältnis:* Ein Ausdruck der relativen Menge von Adenin-Thymin zu Guanin-Cytosin-Paaren in einem DNA-Molekül.
- Ablesefehler.* Der falsche Einbau eines Aminosäurerestes in eine Polypeptidkette während der Proteinsynthese.
- Actinomycin D.* Antibiotikum, das die Verlängerung von RNA-Ketten verhindert.
- Adaptor-Moleküle.* Kleine RNA-Moleküle (sRNA = soluble = lösliche RNA), die Aminosäuren während der Proteinsynthese an die richtigen Stellen auf einer mRNA-Matrize binden. Jedes ist sowohl für eine Aminosäure als auch für ein Matrizencodon spezifisch.
- Adenylcyclase.* Enzym, das die Synthese von zyklischem AMP aus ATP katalysiert.
- Aktives Zentrum.* Bereich eines Enzyms, der direkt an der Wechselwirkung mit anderen Molekülen beteiligt ist.
- Aktivierende Enzyme.* (Siehe Aminoacylsynthetase).
- Allele.* Eine von zwei oder mehreren alternativen Formen eines Gens.
- Allosterische Proteine.* Proteine, deren biologische Eigenschaften durch die Bindung spezifischer, kleiner Moleküle (allosterische Effektormoleküle) an andere Stellen als das aktive Zentrum verändert werden.
- Aminoacyl-adenylat (AS ~ AMP).* Eine aktivierte Verbindung, die ein Zwischenprodukt bei der Bildung kovalenter Bindungen zwischen einer Aminosäure und ihrem sRNA-Adaptor ist. Spielt bei der Proteinsynthese eine Rolle.
- Aminoacylsynthetase.* Jedes der mindestens zwanzig verschiedenen Enzyme, die 1) die Reaktion einer spezifischen Aminosäure mit ATP zu Aminoacyl-AMP (aktivierte Aminosäuren) und Pyrophosphat und 2) den Transfer der aktivierten Aminosäure auf sRNA unter Bildung von Aminoacyl-sRNA und freiem AMP katalysieren.

*Aminoende.* Dasjenige Ende einer Polypeptidkette, das eine freie  $\alpha$ -Aminogruppe trägt.

*Aminogruppe.*  $-NH_2$ , eine chemische Gruppe, die wegen der Anlagerung eines Protons unter Bildung von  $-NH_3^+$  als Base reagiert.

*Aminosäuren.* Die Bausteine der Proteine. Es gibt 20 übliche Aminosäuren, die alle als das L-Stereoisomere vorkommen. Alle Aminosäuren haben die gleiche Grundstruktur, variieren aber in ihren Seitenketten (R);



*Aminosäure-Seitenkette(n).* (Siehe Aminosäuren).

*Aminosäuresequenz.* Die lineare Reihenfolge der Aminosäuren in einem Peptid oder Protein.

*Ångström ( $\text{\AA}$ ).* Eine Längeneinheit für die Beschreibung atomarer Größenbereiche; entspricht  $10^{-8}$  cm.

*Antigen.* Jede Substanz, die nach Injektion in ein Wirbeltier die Produktion neutralisierender Antikörper stimulieren kann.

*Antigene Determinante.* Eine chemische Struktur (klein im Vergleich zum Makromolekül), die von der aktiven Antikörperbindungsstelle erkannt wird. Bestimmt die Spezifität einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung.

*Anti- $\sigma$ -Faktor.* Protein, das die Erkennung eines Initiierungspunktes durch den  $\sigma$ -Faktor der RNA-Polymerase verhindert. Ein Anti- $\sigma$ -Faktor wird während der Infektion mit dem Phagen T4 synthetisiert

*Antiterminationsfaktor.* Protein, das die normale Termination der RNA-Synthese verhindert, möglicherweise, weil es die Funktion des  $\rho$ -Faktors unterbindet. Das «N»-Genprodukt des Bakteriophagen  $\lambda$  könnte ein Antiterminationsfaktor sein.

*Aromatische Aminosäuren.* Aminosäuren, deren Seitenketten Benzol-Derivate enthalten. In Proteinen findet man die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

*Autoradiographie.* Nachweis radioaktiver Markierung in zytologischen Präparaten und in Makromolekülen durch die Belichtung eines photographischen Films.

*Autoradiographien.* Wenn man eine Photoemulsion mit radioaktivem Material (z.B. einem dünnen Schnitt durch eine Zelle) in Kontakt bringt, wird der Film der Strahlung ausgesetzt, wodurch Details der Position und Geometrie der radioaktiven Verbindungen sichtbar werden.

*Bakterienviren.* Viren, die sich in Bakterien vermehren.

*Bakteriophagen (Phagen).* (Siehe *Bakterienviren*).

*Basenanaloga.* Purine und Pyrimidine, die sich in ihrer Struktur leicht von den normalen Stickstoffbasen unterscheiden. Einige Analoga (z.B. 5-Bromuracil) können an Stelle der üblichen Basen in Nukleinsäuren eingebaut werden.

*Basenpaarungsregeln.* Die Notwendigkeit, daß in einer Nukleinsäure-Doppelhelix Adenin immer mit Thymin (oder Uracil) und Guanin mit Cytosin Basenpaare bilden müssen.

*Basische Aminosäuren.* Aminosäuren, die bei neutralem pH eine positive Ladung tragen.

*Bedingt-letale Mutationen.* Eine Klasse von Mutanten, deren Lebensfähigkeit von den Wachstumsbedingungen abhängt (z.B. temperatursensitive letale Mutanten).

*Befruchtung.* Verschmelzung der Gameten verschiedenen Geschlechts zu diploiden Zygoten.

*Bence-Jones Protein.* Leichte Ketten einer einzigen Antikörperspezies, die von Myelomzellen synthetisiert werden. Man findet sie im allgemeinen im Urin von Patienten mit multiplem Myelom.

*$\beta$ -Galaktosidase.* Ein Enzym, das die Hydrolyse von Lactose in Glucose und Galactose katalysiert; bei *E. coli* das klassische Beispiel eines induzierbaren Enzyms.

*Biologische Uhren.* Mechanismen, die erlauben, daß bestimmte biologische Strukturen (Gene) sich in periodischen Zeitabständen ausdrücken. Möglicherweise sind  $\sigma$ - und Anti- $\sigma$ -Faktoren beteiligt.

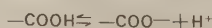
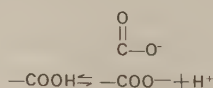
*Bruch und Wiedervereinigung.* Das klassische Modell des Crossing-over durch einen tatsächlichen Bruch und die kreuzweise Wiedervereinigung fertiger Chromatide während der Meiose. Es wurde kürzlich gezeigt, daß dieses Modell, zumindest auch für einen Fall, auf molekularer Ebene gültig ist - man fand, daß Crossing-over zwischen Phagen-DNA-Molekülen ebenfalls über Bruch und Wiedervereinigung verläuft.

$^{14}\text{C}$ . Ein radioaktives Kohlenstoffisotop, das energiearme  $\beta$ -Teilchen (Elektronen) abgibt. Seine Halbwertszeit beträgt 5700 Jahre.  $^{14}\text{C} \rightarrow ^{13}\text{N} + \beta$

*Carboxylende.* Das Ende einer Polypeptidkette, das eine freie  $\alpha$ -Carboxylgruppe trägt.

*Carboxylgruppe.* Eine chemische Gruppe, die sauer reagiert, da das H ihrer

Hydroxylgruppe unter Bildung von H und  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$  dissoziieren kann um





*Chromatide.* Die zwei Tochterstränge eines verdoppelten Chromosoms, die noch über ein Zentromeres verbunden sind.

*Chromomeres.* Konzentriertes Chromatinkügelchen auf dem Eukaryoten-Chromosom. Möglicherweise Bereiche, in denen Genredundanz vorliegt. Entsteht durch lokale Verknäuelung fortlaufender Fäden.

*Codon.* Eine Folge von drei benachbarten Nukleotiden, die eine Aminosäure (oder den Kettenabbruch?) codieren.

*Crossing-over.* Der Vorgang, bei dem genetisches Material zwischen homologen Chromosomen ausgetauscht wird.

*Dalton.* Gewichtseinheit, die dem Gewicht eines einzelnen Wasserstoffatoms entspricht.

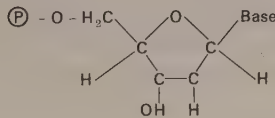
*Defektes Virus.* Ein Virus, das allein nicht in der Lage ist, sich zu vermehren, wenn es seine Wirtszelle infiziert; kann sich jedoch in Anwesenheit eines anderen Virus vermehren.

*Deletion.* Verlust eines Teiles des genetischen Materials aus einem Chromosom. Es können sowohl einzelne Nukleotide als auch ganze Abschnitte mit mehreren Genen verloren gehen.

*Denaturierung.* Der Verlust der nativen Konfiguration eines Makromoleküls, z.B. infolge von Hitzebehandlung, extremen pH-Veränderungen, chemischer Behandlung oder anderen Denaturierungsmitteln; meist von einem Verlust der biologischen Aktivität begleitet.

*Desoxynukleosid.* Das Kondensationsprodukt aus Purin- oder Pyrimidinbasen und dem Pentosezucker 2-Desoxyribose.

*Desoxyribonukleotid.* Eine Verbindung aus einer Purin- oder Pyrimidinbase mit dem Zucker 2-Desoxyribose, der seinerseits an eine Phosphatgruppe gebunden ist.



*Dimeres.* Struktur, die durch die Verbindung zweier identischer Untereinheiten entsteht.

*Diploider Zustand.* Der Zustand, in dem jede Chromosomensorte außer den Geschlechtschromosomen zweimal im Chromosomensatz vertreten ist (2N).

*Disulfidbindung.* Kovalente Bindung zwischen zwei Schwefelatomen verschiedener Aminosäuren eines Proteins. Wichtig für die Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur.

*DNA (Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure; die Abkürzung DNA wird international verwendet).* Ein Polymeres aus Desoxyribonukleotiden. Das genetische Material aller Zellen.

*DNA-Polymerase.* Ein Enzym, das unter Verwendung von DNA als Matrix die Bildung von Polydesoxyribonukleotid-Strängen aus Desoxyribonukleosid-triphosphaten katalysiert.

*DNA-RNA-Hybride.* Eine Doppelhelix, die aus einer DNA-Kette und einer RNA-Kette besteht, die über Wasserstoffbrücken durch komplementäre Basenpaare miteinander verbunden sind.

*Drei-Faktor-Kreuzungen.* Paarungsversuche unter Verwendung dreier unterschiedlicher genetischer Marker (z.B.  $a^+ b^+ c^+ \times abc$ ).

*Elektronegatives Atom.* Ein Atom, das Elektronen anzieht.

*Elektronenmikroskopie.* Eine Technik zur Sichtbarmachung von Material, die statt Lichtstrahlen Elektronenstrahlen verwendet und daher eine höhere Vergrößerung als das Lichtmikroskop erlaubt. Bei biologischem Material kann man eine Auflösung von  $\sim 10 \text{ \AA}$  erreichen.

*Endonuklease.* Ein Enzym, das Schnitte im Inneren der Ketten des DNA-Skeletts ausführt.

*Endprodukt.* Eine chemische Verbindung, die das letzte Produkt einer Kette von Stoffwechselreaktionen darstellt.

*Energiereiche Bindung.* Eine Bindung, deren Hydrolyse zu einer großen Abnahme der freien Energie führt (mindestens 5 kcal/Mol).

*Entartete Codons.* Zwei oder mehr Codons, die die gleiche Aminosäure codieren.

*Enzyme.* Proteinmoleküle, die chemische Reaktionen katalysieren können.

*Episom.* Genetisches Material, das sowohl frei als auch als Bestandteil eines normalen zellulären Chromosoms vorliegen kann. Beispiele für Episomen sind der Geschlechtsfaktor ( $F^+$ ) und die DNA lysogener Phagen.

*Erbkrankheit.* Ein pathologischer Zustand, der auf eine Genmutation zurückzuführen ist und daher von einer Generation auf die nächste übertragen werden kann.

*Erythroblasten.* Kernhaltige Zellen im Knochenmark, die zu roten Blutzellen differenzieren.

*Etablierte Zelllinie.* Kultivierte Zellen ganz bestimmten Ursprungs, die über viele Generationen stabiles Wachstum aufrecht erhalten können.

*Euchromatin.* Diffuse Form des Chromatins, die aktiv an der RNA-Synthese beteiligt ist.

*Eukaryot.* Organismen, deren Zellen eine Kernmembran, Membran-umgebene Organellen, 80S-Ribosomen und eine charakteristische Biochemie aufweisen.

*Exonuklease.* Ein Enzym, das DNA von den Strangenden her abbaut.

- Feedback-(Endprodukt- oder Rückkopplungs-) Hemmung.* Hemmung der Enzymaktivität des ersten Enzyms eines Stoffwechselweges durch das Endprodukt dieses Weges.
- Fertilitätsfaktor ( $F^+$ ).* Ein Episom, das das Geschlecht eines Bakteriums bestimmt. Die Anwesenheit dieses Faktors in der Zelle macht sie zu einer männlichen Zelle (weibliche Zellen nennt man  $F^-$ ).
- Fluoreszierende Antikörper (Anwendung).* Nachweis eines spezifischen Antigens in Zellen durch Färbung mit einem spezifischen Antikörper, an den ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist.
- Freisetzungsfaktor.* Spezifisches Protein, das an der Erkennung des genetischen Stoppsignals für die Proteinsynthese beteiligt ist.
- Frühe bzw. späte Gene.* Gene, die früh bzw. spät nach Infektion eines Bakteriums mit Bakteriophagen transkribiert werden. Unterscheiden sich möglicherweise dadurch, daß verschiedene  $\sigma$ -Faktoren die jeweiligen Promotor-Regionen erkennen.
- Frühe bzw. späte Proteine.* Während einer Virusinfektion werden Virus-spezifische Proteine zu ganz bestimmten Zeiten nach der Infektion synthetisiert und zwar in Gruppen, die man in «frühe» und «späte» einteilen kann. Sie stehen oft unter der positiven Kontrolle bakterieller und viraler Sigmafaktoren.
- Gekoppelte Gene.* Gene, die auf demselben Chromosom liegen und daher dazu neigen, gemeinsam weitergegeben zu werden.
- Gekoppelte Reaktionen.* Eine thermodynamisch ungünstige Reaktion, die durch Kombination mit einer thermodynamisch günstigen Reaktion nach der Produktbildung hin verschoben wird.
- Genetische Information.* Die Information, die in der Sequenz der Nukleotidbasen der DNA (oder RNA)-Moleküle enthalten ist.
- Genkarte.* Die Anordnung mutierbarer Stellen in einem Chromosom, die man mit genetischen Rekombinationsversuchen ermitteln kann.
- Genotyp.* Die genetische Zusammensetzung eines Organismus (zum Unterschied zu seiner physischen Erscheinungsform oder Phänotyp).
- Genredundanz.* Die Anwesenheit vieler Kopien eines bestimmten Gens in einer einzelnen Zelle. Diese Kopien können entweder ererbt sein oder durch selektive Duplikation von Genen während der Entwicklung entstehen.
- Gewebekultur.* Züchten und Unterhalt von Zellen höherer Organismen *in vitro*, außerhalb ihres ursprünglichen Gewebeverbandes.
- Gleichgewichts-Dichtezentrifugation.* Trennung von Zellorganellen oder Makromolekülen verschiedener Dichten durch Zentrifugieren in einem Dichtegradienten. Der Gradient besteht aus einer Lösung (z.B. von

Rohrzucker oder Caesiumchlorid), die vom Meniskus zum Boden eines Zentrifugenröhrchens an Dichte zunimmt.

*Glykoproteid*. Protein, in dem eine Kohlenhydratgruppe kovalent an den Peptidteil des Moleküls gebunden ist.

*Gruppe (funktionelle)*. Kovalent gebundene Gruppen von Atomen, die sich bei chemischen Reaktionen wie eine Einheit verhalten.

*Gruppenübertragungsreaktionen*. Reaktionen (ausgenommen Oxydationen und Reduktionen), bei welchen Moleküle funktionelle Gruppen austauschen.

$^3\text{H}$  (*Tritium*). Radioaktives Isotop des Wasserstoffs, energieärmerer  $\beta$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 12,5 Jahren.

*Hämoglobin*. Protein, das Sauerstoff aufnehmen kann; Bestandteil roter Blutzellen. Besteht aus zwei Paaren identischer Polypeptidketten und der Eisen enthaltenden Hämgruppe.

*Haploider Zustand*. Zustand, in dem jedes Chromosom nur einmal pro Zelle vertreten ist.

*HeLa-Zellen*. Etablierte Zelllinie eines menschlichen Cervix-Karzinoms (Krebs). Wird seit vielen Jahren zur Untersuchung der Biochemie und des Wachstums menschlicher Gewebekulturzellen verwendet.

*Helfervirus*. Ein Virus, das durch die Infektion einer Zelle eine oder mehrere Funktionen übernimmt, die einem defekten Virus fehlen und es daher ermöglicht, daß das defekte Virus sich vermehrt.

*Helix*. Eine schraubenförmige Struktur mit einem bestimmten Muster, das sich stets wiederholt und durch zwei gleichzeitige Operationen beschrieben wird: Rotation und Translation. Die natürliche Konformation vieler regelmäßiger Biopolymerer.

*Hepatom*. Eine spezifische Form des Leberkrebses.

*Heterochromatin*. Kondensierte Form des Chromatins, an der relativ wenig RNA synthetisiert wird.

*Heteroduplex*. Doppelsträngiges DNA-Molekül, in dem die Basensequenzen der beiden Stränge nicht vollständig komplementär sind. Kann durch Mutation, Rekombination oder durch Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen *in vitro* entstehen.

*Hfr* (*High Frequency of Recombination, hohe Frequenz der Rekombination*). *E. coli*-Stämme, die eine ungewöhnlich hohe Rekombinationshäufigkeit aufweisen. In diesen Zellen ist der F-Faktor in das Bakterienchromosom integriert; man nimmt an, daß er dort eine gewisse Rolle beim Transfer des Chromosoms von Hfr auf  $\text{F}^-$ -Zellen spielt (siehe auch *Fertilitätsfaktor*).

*Histone*. Proteine, die reich an basischen Aminosäuren (z.B. Lysin<sup>+Arg</sup>) sind und in den Chromosomen aller Eukaryoten außer den Samenzellen, in wel-



chen die DNA spezifisch mit einer anderen Gruppe basischer Proteine, den Protaminen, assoziiert ist, gefunden werden.

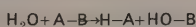
*Homologe Chromosomen.* Chromosomen, die sich während der Meiose paaren, die gleiche Morphologie haben und Gene tragen, die die gleichen Merkmale kontrollieren.

*Hormone.* Chemische Substanzen (häufig kleine Polypeptide), die in einem Organ eines Organismus synthetisiert werden und die funktionelle Aktivität in Zellen anderer Gewebe und Organe stimulieren. Viele wirken über die Stimulation der Adenylcyclase in der Zellmembran, was zur Synthese von zyklischem AMP führt.

«*Hot spots*». Stellen auf Genen, an denen Mutationen mit ungewöhnlich hoher Frequenz auftreten.

*Hüllprotein(e).* Die äußeren Strukturproteine eines Virus.

*Hydrolyse.* Die Spaltung eines Moleküls in zwei oder mehrere kleine Moleküle durch Wasseraufnahme:



*Hydrophil.* Eigenschaft von Molekülen oder Gruppen, die bereitwillig mit Wasser assoziieren.

*Hydrophob.* Buchstäblich: «der das Wasser haßt». Bezeichnend für Eigenschaft von Molekülen oder bestimmten funktionellen Gruppen in Molekülen, die -im günstigsten Falle- nur schwach wasserlöslich sind.

*Hydrophobe Bindungen.* Die Assoziation unpolarer Gruppen miteinander in wäßrigen Lösungen, die auf der Neigung des Wassers, unpolare Moleküle auszuschließen, beruht.

*Immunglobulin.* Proteinmolekül, das von einer Plasmazelle produziert wird und ein spezifisches Antigen erkennt und bindet. Auch Antikörper genannt.

*Immunologische Toleranz.* Fehlen einer Immunreaktion gegen Antigene, das auf der Erkennung von «Selbst» beruht oder durch sehr hohe Antigen-dosen induziert werden kann.

*Immunsuppressiva.* Substanzen, die die normale Reaktion der Antikörper-produzierenden Zellen gegen Antigen blockieren.

*Induktoren.* Moleküle, die die Produktion größerer Mengen derjenigen Enzyme veranlassen, die an ihrer Aufnahme in die Zelle und ihrem Stoffwechsel beteiligt sind. Als Vergleich dienen Zellen, die in Abwesenheit des Induktors wachsen.

*Induzierbare Enzyme.* Enzyme, deren Syntheserate durch die Anwesenheit des Induktors in der Zelle gesteigert werden kann.

*Infektiöse Virusnukleinsäure.* Gereinigte Virusnukleinsäure, die eine Wirtszel-

le infizieren und die Produktion von Virusnachkommenschaft bewirken kann.

*Initiationsfaktoren.* Drei Proteine ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ), die für die Initiierung der Proteinsynthese benötigt werden.

*Intergene Suppression.* Wiederherstellung einer verlorenen Funktion durch eine zweite Mutation, die in einem anderen Gen als die ursprüngliche Mutation stattfindet.

*Intermediärstoffwechsel.* Die chemischen Reaktionen einer Zelle, durch die Nährstoffmoleküle in Moleküle umgewandelt werden, die für die Struktur und das Wachstum einer Zelle notwendig sind.

*Intragenes Suppression.* Wiederherstellung einer verlorenen Funktion durch eine zweite Mutation im selben Gen wie die ursprüngliche Mutation.

*In Vitro* (Lateinisch: im Glas). Beschreibt Versuche, die in zellfreien Systemen durchgeführt werden. Heute wird der Ausdruck auch auf das Wachstum von Zellen multizellulärer Organismen in Gewebekultur angewendet.

*In Vitro Proteinsynthese.* Der Einbau von Aminosäuren in Polypeptidketten in einem zellfreien System.

*In Vivo* (Lateinisch: im Lebenden). Beschreibt Versuche, die in Systemen durchgeführt werden, bei denen der Organismus intakt bleibt; entweder auf der Ebene der Zelle (Bakterien) oder der des gesamten Organismus (Tiere).

*Kalorie.* Ein Maß für die Energie, definiert als die Menge von Energie, die zugeführt werden muß, um 1 g Wasser um  $1^\circ \text{C}$  zu erwärmen.

*Karteneinheiten.* Ein Wert, der der Rekombinationshäufigkeit zwischen zwei Genen proportional ist. Eine Karteneinheit entspricht einer Rekombinationshäufigkeit von 1 Prozent.

*Karzinogen.* Krebsauslösendes Agens.

*Katabolite.* Verbindungen, die Abbauprodukte von Nährstoffmolekülen darstellen.

*Katabolit-vermittelte Repression.* Reduzierte Synthese bestimmter Enzyme in Bakterien, die auf Glucose oder anderen guten Quellen für Katabolite wachsen. Wird durch die geringe Konzentration von zyklischem AMP in diesen Zellen hervorgerufen.

*Katalysator.* Substanz, die die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion steigern kann, ohne selbst verbraucht zu werden (z.B. katalysieren Enzyme biologische Reaktionen).

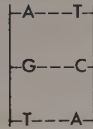
*Klon.* Eine Gruppe von Zellen, die alle von einer gemeinsamen Ursprungszelle abstammen.

*Kohlenwasserstoff-Seitenketten.* Aminosäure-Seitenketten, die nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen.

**Kolonie.** Eine Gruppe eng benachbarter Zellen, die im allgemeinen von einer einzigen Ursprungszelle abstammen und auf einer festen Oberfläche wachsen.

**Komplementäre Basensequenzen.** Polynukleotidsequenzen, die miteinander über die Basenpaarungsregeln in Beziehung stehen.

**Komplementäre Strukturen.** Zwei Strukturen, die einander definieren; z.B. die beiden Stränge einer DNA-Helix.



**Komplementationstest.** Die Einführung zweier mutierter Chromosomen oder Chromosomenabschnitte in dieselbe Zelle, um zu sehen, ob die jeweiligen Mutationen im selben Gen liegen.

**Konstitutive Enzyme.** Enzyme, die unabhängig von den Wachstumsbedingungen in festgelegten Mengen synthetisiert werden.

**Kontaktinhibition.** Das Ende der Zellbewegung (Teilung ?), das man häufig beobachtet, wenn frei wachsende Zellen eines multizellulären Organismus miteinander in Kontakt kommen.

**Koordinierte Enzymsynthese.** Betrifft Enzyme, deren Syntheserate sich *gemeinsam* ändert. (Z.B. führt die Zugabe von Lactose zu einem Medium, in dem *E. coli*-Zellen in Abwesenheit von  $\beta$ -Galaktosiden wachsen, zur koordinierten Induktion von  $\beta$ -Galaktosidase und  $\beta$ -Galaktosid-Permease).

**Kopolymeres.** Ein polymeres Molekül, das aus mehreren verschiedenen Monomeren aufgebaut ist.

**Korepressoren.** Metabolite, die durch ihre Verbindung mit Repressoren die Bildung von Enzymen, die an ihrem Metabolismus beteiligt sind, spezifisch verhindern.

**Krebs.** Name für eine Krankheitsgruppe, die durch unkontrolliertes Zellwachstum charakterisiert ist.

**Lampenbürsten-Chromosomen.** Riesige diplotäne Chromosomen, die man im Kern von Oozyten findet; zeigen Schlingen, die paarweise aus dem Chromomeren herausragen. Die Schlingen sind die Orte aktiver Genexpression.

**«Leaky» («durchlässiges») Protein.** Ein Protein, das durch ein mutiertes Gen codiert wird und eine gewisse Restaktivität aufweist.

**Leukämie.** Krebsart, die durch eine starke Proliferation funktionsloser, unreifer weißer Blutzellen (Leukozyten) gekennzeichnet ist.

*Leukose.* Unkontrollierte Vermehrung reifer weißer Blutzellen.

*Lösliche RNA (soluble, sRNA).* Siehe Transfer-RNA.

*Lymphom.* Krebs des lymphatischen Gewebes.

*Lyse.* Das Platzen einer Zelle durch Zerstörung der Zellmembran.

*Lysogenes Bakterium.* Ein Bakterium, das einen Prophagen enthält.

*Lysogene Viren.* Viren, die zu Prophagen werden können.

*Lytische Infektion.* Virale Infektion, die zur Lyse der Zelle und spontaner Freisetzung von Nachkommenschaftsviren führt.

*Lytische Viren.* Viren, deren Vermehrung zur Lyse der Wirtszellen führt.

*Makromoleküle.* Moleküle, deren Molekulargewicht zwischen einigen tausend und hunderten von Millionen liegt.

*Markierung (Radioaktive).* Ein radioaktives Atom, das in ein Molekül eingeführt wird, um seine metabolischen Umwandlungen leichter verfolgen zu können.

*Matrize.* Der makromolekulare Druckstock für die Synthese anderer Makromoleküle.

*Matrizen-RNA (siehe Messenger-RNA).*

*Mesosom.* Eine Invagination der Bakterienzellwand. Steht in Beziehung zur DNA-Replikation.

*Messenger-RNA (mRNA; deutsch auch gelegentlich Boten-RNA).* RNA, die als Matrize für die Proteinsynthese dient.

*Micron ( $\mu$ ).* Längeneinheit, die sich für die Beschreibung zellulärer Dimensionen eignet; entspricht  $10^{-3}$  cm oder  $10^5$  Å.

*Missense-Mutation.* Eine Mutation, die ein Codon, das eine Aminosäure codiert, in das Codon einer anderen Aminosäure umwandelt.

*Mitotische Rekombination.* Crossing-over zwischen homologen Chromosomen während der Mitose, das zur Segregation heterozygoter Allele führt.

*Molekulargewicht.* Die Summe der Gewichte der Atome, aus denen ein Molekül besteht.

*Monolayer.* Ein Zellrasen, der einheitlich eine Zellschicht tief ist.

*Monomeres.* Die Grundeinheit, aus der durch Wiederholung einer einzigen Reaktion Polymere aufgebaut werden. Zum Beispiel kondensieren die Aminosäuren (Monomere) zu Polypeptiden oder Proteinen (Polymere).

*Mutagene.* Physikalische oder chemische Mittel, wie z.B. Bestrahlung, Hitze oder alkylierende und desaminierende Substanzen, die die Mutationshäufigkeit weit über das natürliche Maß erhöhen.

*Mutation.* Eine erbliche Veränderung in einem Chromosom.

*Mutierbare Stellen.* Stellen auf einem Chromosom, an denen Mutationen auftreten können. Genetische Versuche zeigen, daß jede mutierbare Stelle in mehreren alternativen Formen vorkommen kann.



*Myelom.* Krebs von Antikörper-produzierenden Zellen, der auf der Proliferation eines einzigen Plasmazell-Klones beruht, der reines Immunglobulin produziert.

*Negative Kontrolle.* Verhinderung biologischer Aktivität durch die Anwesenheit eines spezifischen Moleküls; ein eindrucksvolles Beispiel ist die Hemmung des mRNA-Synthesestarts durch Bindung spezifischer Repressoren an spezifische Stellen auf dem DNA-Molekül.

*Nonsense-Mutation.* Eine Mutation, die ein Codon, das für eine Aminosäure steht, in ein anderes umwandelt, das keine Aminosäure codiert (ein Nonsense-Codon). Nonsense-Codons führen wahrscheinlich zum Abbruch der Polypeptidkette.

*Nukleinsäure.* Ein Nukleotid-Polymeres (siehe auch DNA und RNA).

*Nukleolus.* Runde, granuläre Struktur im Kern von Eukaryoten, im allgemeinen in Verbindung mit spezifischen chromosomalen Orten. An der rRNA-Synthese und der Bildung von Ribosomen beteiligt.

*Oozyt.* Unbefruchtete Eizelle.

*Operator.* Eine Region auf dem Chromosom, die direkt (oder indirekt ?) mit einem spezifischen Repressor in Wechselwirkung treten kann, und dadurch die Funktion eines benachbarten Operons kontrolliert.

*Operon.* Eine genetische Einheit, aus benachbarten Genen bestehend, die koordiniert unter der gemeinsamen Kontrolle eines Operators und eines Repressors steht.

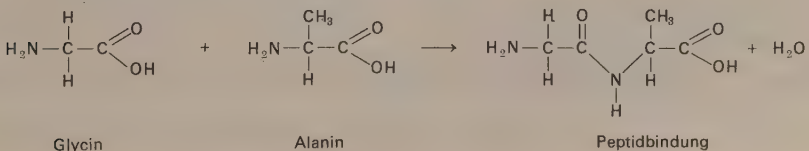
*Organelle.* Von einer Membran umgebene Struktur, die man in Eukaryoten findet; enthält Enzyme für spezialisierte Aufgaben. Einige Organellen, einschließlich der Mitochondrien und Chloroplasten, enthalten DNA und können sich selbständig replizieren.

*Östrogen.* Hormon, das von den Ovarien produziert wird.

<sup>32</sup>P. Ein radioaktives Isotop des Phosphors, das energiereiche  $\beta$ -Strahlen aussendet und eine Halbwertszeit von 14,3 Tagen hat.

*Paarung.* Die längseitige Anlagerung zweier homologer Chromosomen vor dem Crossing-over.

*Peptidbindung.* Eine kovalente Bindung zwischen zwei Aminosäuren, bei der die  $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure unter Wassereliminierung mit der  $\alpha$ -Carboxylgruppe der anderen reagiert.



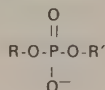
*Permissive bzw. nicht-permissive Zellen.* Permissive Zellen gestatten die lytische Infektion durch ein bestimmtes Virus. Nichtpermissive Zellen lassen das nicht zu.

*Phage.* (Siehe Bakterienviren).

*Phagenkreuzung.* Multiple Infektion eines einzelnen Bakteriums mit Bakteriophagen, die sich an einem oder mehreren genetischen Orten unterscheiden. Das führt zur Produktion von rekombinanten Phagennachkommen, die Gene beider parentaler Phagentypen tragen.

*Phänotyp.* Die der Beobachtung zugänglichen Eigenschaften eines Organismus; werden gemeinsam durch den Genotyp und die Umwelt hervorgerufen.

*Phosphodiester.* Jedes Molekül, das die folgende Bindung enthält,



wobei R und R' Kohlenstoff-haltige Gruppen (z.B. Nukleoside) sind; O ist Sauerstoff, P Phosphor.

*Plaques.* Runde, klare Zonen in einem zusammenhängenden Zellrasen, die durch Abtötung oder Lyse benachbarter Zellen durch mehrere Wachstumszyklen des Virus entstehen.

*Polare Mutation.* Mutation in einem Gen, welche die Expression eines anderen Gens, das weiter entfernt vom Promotor im selben Operon liegt, beeinträchtigt. Nonsense-Mutationen sind häufig polar.

*Polaritätsgradient.* Quantitativer Effekt polarer Mutationen in einem Gen auf die Expression späterer Gene desselben Operons. Abhängig vom Abstand zwischen dem Nonsense-Codon und dem nächsten Initiierungssignal für eine Polypeptidkette.

*Polymeres.* Eine regelmäßige, kovalent gebundene Anordnung von Untereinheiten (Monomeren), die durch wiederholte Anwendung einer oder weniger chemischer Reaktionen entsteht.

*Polynukleotid.* Eine lineare Reihenfolge von Nukleotiden, in welcher die 3'-Position des Zuckers in einem Nukleotid über eine Phosphatgruppe mit der 5'-Position des Zuckers des benachbarten Nukleotids verbunden ist.

*Polynukleotid-Ligase.* Enzym, das die Bindungen im DNA-Skelett kovalent knüpft.

*Polypeptid.* Ein Polymeres aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen verknüpft sind.

*Polyribosom.* Komplex zwischen einem Messenger-RNA-Molekül und Ribo-

somen (deren Zahl von der Größe der mRNA abhängt); ist aktiv an der Polypeptidsynthese beteiligt.

*Polytäre Chromosomen.* Riesenchromosomen, die aus vielen Fäden (bis zu 2000) bestehen und durch aufeinanderfolgende Chromatidverdoppelungen entstehen. Paarung vieler identischer Chromomeren führt zu den charakteristischen Bandenmustern.

*Positive Kontrolle.* Kontrolle durch Regulatorproteine, deren Anwesenheit in der richtigen Konformation für die Expression des Gens notwendig ist.

*Primärstruktur von Proteinen.* Die Zahl der Polypeptidketten in einem Protein, die Aminosäuresequenz in diesen Ketten und die Anordnung von Disulfidbrücken innerhalb der Ketten und zwischen ihnen.

*Prokaryot.* Einfacher einzelliger Organismus, wie z.B. Bakterien oder die blaugrünen Algen, die keine Kernmembran, keine Membran-umgebenen Organellen, und typische Ribosomen und Biosynthesevorgänge aufweisen.

*Promotor.* Region auf der DNA, an die die RNA-Polymerase bindet und die Transkription initiiert.

*Prophage.* Der Provirus-Zustand (siehe unten) eines lysogenen Phagen.

*Provirus.* Der Zustand eines Virus, in dem es in das Wirtszellchromosom integriert ist und daher von einer Zellgeneration an die nächste weitergegeben wird.

*Puromycin.* Antibiotikum, das die Polypeptidsynthese verhindert, indem es mit Aminoacyl-tRNA um die ribosomale Bindungsstelle «A» konkurriert.

*Radioaktive Isotope.* Ein Isotop mit einem instabilen Kern, der sich durch Abgabe ionisierender Strahlen stabilisiert.

*Regulatorgene.* Gene, deren Hauptaufgabe die Kontrolle der Synthesehäufigkeit anderer Genprodukte ist.

*Rekombination.* Das Auftreten von Merkmalen in der Nachkommenschaft, die gemeinsam in keinem der Elternteile vorhanden waren.

*Renaturierung.* Die Rückkehr eines Proteins oder einer Nukleinsäure aus dem denaturierten Zustand in die «native» Konfiguration.

*Reparatursynthese (Repair).* Enzymatischer Ausschnitt und Ersatz einer beschädigten DNA-Region. Am besten untersucht ist die Reparatur von Thymindimeren durch UV-Bestrahlung.

*Replikationsgabel.* Y-förmige Chromosomenregion, die einen Wachstumspunkt bei der DNA-Replikation darstellt.

*Replikative Form (RF).* Die Struktur einer Nukleinsäure während ihrer Replikation - der Ausdruck wird am häufigsten zur Bezeichnung doppelhelikaler Zwischenstufen bei der Replikation einzelsträngiger DNA- und RNA-Viren verwendet.

*Repressor.* Das Produkt eines Regulatorgens; man glaubt heute, daß es ein Protein ist, das sich sowohl mit dem Induktor (oder Korepressor) als auch mit einem Operator (oder seinem mRNA-Produkt) verbinden kann.

*Reprimierbare Enzyme.* Enzyme, deren Syntheserate vermindert wird, wenn die intrazelluläre Konzentration bestimmter Metaboliten ansteigt.

*Retikulozyt.* Unreife rote Blutzelle, die aktiv Hämoglobin synthetisiert.

*$\rho$ -Faktor.* Protein, das für den korrekten Abschluß der Synthese von RNA-Molekülen wichtig ist.

*Ribonukleotide.* Verbindungen aus Purin- und Pyrimidinbasen mit Ribose, die ihrerseits mit einer Phosphatgruppe verestert ist.

*Ribosomale Proteine.* Eine Gruppe von Proteinen, die sich über nichtkovalente Bindungen an rRNA binden und so den Ribosomen ihre 3-D-Struktur geben.

*Ribosomale RNA (rRNA).* Die Nukleinsäurekomponente der Ribosomen; macht zwei Drittel der Gesamtmasse von *E. coli* Ribosomen und ungefähr die Hälfte der Masse von Säugetierribosomen aus. 80 Prozent des RNA Gehaltes einer Bakterienzelle ist ribosomale RNA.

*Ribosomen.* Kleine zelluläre Partikeln ( $\sim 200 \text{ \AA}$  Durchmesser), die aus rRNA und Protein bestehen. An den Ribosomen wird Protein synthetisiert.

*RNA (Ribonukleinsäure).* Polymeres aus Ribonukleotiden.

*RNA-Polymerase.* Ein Enzym, das die Bildung von RNA aus Ribonukleosidtriphosphaten katalysiert, wobei DNA als Matrize dient.

*Röntgenkristallographie.* Verwendung von Beugungsmustern, die durch Streuung der Röntgenstrahlen an Kristallen entstehen, um die 3-D-Gestalt von Molekülen zu bestimmen.

*Rückmutation.* Eine vererbliche Veränderung in einem mutierten Gen, die die ursprüngliche Nukleotidsequenz wiederherstellt.

<sup>35</sup>S. Radioaktives Isotop des Schwefels.  $\beta$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 87 Tagen; sehr geeignet für Untersuchungen von Proteinsystemen, da es über schwefelhaltige Aminosäuren in Proteine eingebaut werden kann.

*Saure Aminosäuren.* Aminosäuren, die bei neutralem pH eine negative Ladung tragen.

*Schwache Wechselwirkungskräfte (auch sekundäre Valenzen genannt).* Kräfte zwischen zwei Atomen, die schwächer sind als die kovalenten Bindungen (z.B. ionische Bindungen, Wasserstoff-Brückenbindungen und van der Waals-Kräfte).

*Schwere Isotope.* Atome, die mehr Neutronen enthalten als die anderen



Atome derselben Ordnungszahl und deshalb eine höhere Dichte als die für gewöhnlich beobachteten Isotopen besitzen (z.B.  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ).

*Serum-Proteine.* Proteine, die man im (zellfreien) Serumanteil des Blutes findet; dazu gehören Immunglobuline, Albumin, Gerinnungsfaktoren und Enzyme.

*$\sigma$ -Faktor.* Untereinheit der RNA-Polymerase, die auf der DNA spezifische Stellen für die Initiierung der RNA-Synthese erkennt.

*Skelett.* Die Atome eines Polymeren, die in allen seinen Molekülen vorkommen (z.B. die Zucker- und Phosphatreste der RNA).

*Somatische Mutation.* Jede Mutation, die in einer Zelle auftritt, die keine Keimzelle ist.

*Spaltungsteilung.* Die mitotischen Teilungen eines befruchteten Eies bis zu dem Stadium, in dem die Bereiche des Eies sich relativ zueinander verlagern.

*Spontane Mutationen.* Mutationen ohne «ersichtlichen» Grund.

*Sporulation.* Der Vorgang, bei dem aus vegetativen Zellen von Bakterien und anderen Organismen trockene, metabolisch inaktive Zellen hervorgehen, die eine dicke Oberflächenschicht haben (Sporen) und extreme Umweltbedingungen überdauern können.

*Stereoisomere.* Moleküle, die die gleiche Strukturformel, aber verschiedene räumliche Anordnung unterschiedlicher Gruppen haben, die alle an ein gemeinsames Atom gebunden sind. Viele der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Stereoisomeren sind gleich, aber es bestehen Unterschiede in ihrer Kristallstruktur, der Richtung, in die sie polarisiertes Licht drehen, und ihrer Fähigkeit in Enzym-katalysierten Reaktionen als Substrat zu dienen. Die letztgenannte Eigenschaft ist für biologische Systeme besonders wichtig.

*Sterisch (Stereochemisch).* Bezieht sich auf die räumliche Anordnung der Atome in einem Molekül.

*Stickstoffbasen.* Ein aromatisches, stickstoffhaltiges Molekül mit Basencharakter (neigt dazu, H-Atome anzulagern). Wichtige Stickstoffbasen der Zelle sind die Purine und Pyrimidine.

*Stoffwechselweg.* Eine Reihe aufeinander folgender intrazellulärer enzymatischer Reaktionen, die ein Molekül in ein anderes umwandeln.

*Suppressorgen.* Ein Gen, das die phänotypische Auswirkung verschiedener Mutationen in anderen Genen rückgängig machen kann.

*Suppressormutation.* Eine Mutation, die vollständig oder teilweise eine Funktion wiederherstellt, die durch eine primäre Mutation verloren ging und die an einem anderen genetischen Ort, als dem der primären Mutation eintritt.

*Svedberg.* Einheit der Sedimentationsgeschwindigkeit (S). S ist der Sedimentationsgeschwindigkeit eines Moleküls in einem gegebenen Schwerfeld

proportional und steht daher in Beziehung zum Molekulargewicht und der Gestalt des Moleküls.

*Synthetische Polyribonukleotide.* RNA, die *in vitro* ohne Nukleinsäurematrize durch enzymatische oder chemische Synthese gemacht wird.

«T»-Antigen. Antigen, das im Kern von Zellen gefunden wird, die mit bestimmten Tumorstämmen (z.B. Polyoma, SV40) infiziert oder durch sie transformiert sind. Vielleicht ein Virus-spezifisches Frühprotein.

*Tautomere Umlagerung.* Reversibler Positionswechsel eines Protons in einem Molekül, der die chemischen Eigenschaften des Moleküls verändert.

*Temperatur-sensitive Mutation.* Mutation, die zu einem Protein führt, das bei niedriger (hoher) Temperatur aktiv ist, aber durch Erhöhung (Senkung) der Temperatur inaktiviert wird.

*Tertiärstruktur (eines Proteins).* Die 3-D-Faltung einer Polypeptidkette (-ketten) die ein Protein im nativen Zustand charakterisiert.

*Tetrameres.* Struktur, die durch Zusammenlagerung von vier Untereinheiten entsteht.

*Transduktion.* Transfer eines bakteriellen Gens durch eine Bakteriophagenpartikel von einem Bakterium auf ein anderes.

*Transferasen.* Enzyme, die den Austausch funktioneller Gruppen katalysieren.

*Transferfaktoren.* Zwei Proteine, die für die Knüpfung der Peptidbindung an die Ribosomen benötigt werden. Transferfaktor I beteiligt sich an der Bindung beladener tRNAs an die Ribosomen. Transferfaktor II bewegt die Peptidyl-tRNAs von der «A» an die «P»-Bindungsstelle des Ribosoms.

*Transfer-RNA (tRNA).* Eine von mindestens zwanzig strukturell ähnlichen RNA-Spezies, die alle ein MG  $\sim 25.000$  haben. Jede tRNA (sRNA)-Spezies kann sich kovalent mit einer spezifischen Aminosäure verbinden und Wasserstoffbrücken mit mindestens einem mRNA-Nukleotidtriplett eingehen. Wird auch Adaptor-RNA oder lösliche (soluble)-RNA (sRNA) genannt.

*Transformation.* Genetische Veränderung, die durch Einbau von gereinigter zellulärer oder viraler DNA in eine Zelle hervorgerufen wird.

*Transkription.* Vorgang, bei dem die genetische Information der DNA für Reihung komplementärer Basensequenzen in einer RNA-Kette verwendet wird; läuft über Basenpaarungen ab.

*Translation.* Vorgang, bei dem während der Proteinsynthese die genetische Information der mRNA-Moleküle für die Reihung der spezifischen Aminosäuren verwendet wird.

*Translationskontrolle.* Regulation der Genexpression durch die Kontrolle der Translationsgeschwindigkeit spezifischer mRNA-Moleküle.

*Tumovirus*. Ein Virus, das Tumoren hervorruft.

*Turnover Number (Umsatzzahl eines Enzyms)*. Die Zahl von Substratmolekülen, die pro Minute durch ein einziges Enzymmolekül bei maximaler Geschwindigkeit umgesetzt wird.

*Ultrazentrifuge*. Zentrifuge, die Geschwindigkeiten bis zu 60.000 Umdrehungen/Minute (rpm) und schwere felder bis zu 500.000-facher Erdbeschleunigung erreichen kann, wodurch Makromoleküle rasch sedimentiert werden können.

*UV Strahlung*. Elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen, die kürzer als die des sichtbaren Lichts (3900-2000 Å) sind. Führt zu DNA-Basenpaarungsmutationen und Chromosomenbrüchen.

*van der Waals-Kräfte*. Schwache Anziehungskräfte, die nur über ganz kleine Entfernungen wirken; entstehen durch Anziehung induzierter Dipole.

*Viren*. Infektiöse Krankheitserreger, kleiner als Bakterien, die für ihre Vermehrung immer intakte Wirtszellen benötigen und entweder DNA oder RNA als genetische Komponente enthalten.

*Virus-spezifisches Enzym*. Ein Enzym das in einer Wirtszelle nach Virusinfektion unter Verwendung des viralen Genoms gemacht wird.

*Wachstumsfaktoren*. Eine spezifische Substanz, die im Wachstumsmedium enthalten sein muß, damit sich eine Zelle vermehren kann.

*Wachstumskurve*. Die Veränderung der Zellzahl in einer wachsenden Kultur als Funktion der Zeit.

*Wasserstoff-Brückenbindung (Wasserstoffbrücke)*. Eine schwache Anziehungskraft zwischen elektronegativen Atomen und Wasserstoff, der kovalent an ein zweites elektronegatives Atom gebunden ist.

*Wildtyp-Gen*. Die Form eines Gens (Allel), die man in der Natur am häufigsten findet.

*Wirtszellen*. Eine Zelle, deren Metabolismus für das Wachstum und die Vermehrung eines Virus benutzt wird.

*Wobble (to wobble = deutsch: wackeln)*. Fähigkeit der dritten Base in tRNA-Anticodon (5'-Ende) mit zwei oder drei verschiedenen Basen am 3'-Ende des Codons Wasserstoff-Brückenbindungen einzugehen. Deshalb kann eine einzige tRNA-Spezies mehrere verschiedene Codons erkennen.

*Zelldifferenzierung*. Der Prozeß, bei dem die Abkömmlinge einer gemeinsamen Elternzelle sich strukturell und funktionell spezialisieren und diese Spezialisierung aufrecht erhalten.

*Zelle*. Die Grundeinheit des Lebens; die kleinste Einheit, die zur unabhängi-

gen Reproduktion fähig ist. Zellen sind stets von einer Membran umgeben.

*Zellfreier Extrakt.* Eine Flüssigkeit, die die meisten löslichen Moleküle einer Zelle enthält; wird durch Aufbrechen der Zellen und Entfernung der restlichen ganzen Zellen erhalten.

*Zellfusion (-verschmelzung).* Bildung einer einzigen hybriden Zelle mit den Kernen und dem Zytoplasma verschiedener Zellen. Wird häufig durch Behandlung von Gemischen verschiedener Zelllinien mit abgetötetem Sendavirus induziert.

*Zelluläre Affinität.* Die Tendenz von Zellen, sich spezifisch an Zellen des gleichen Typs, und nicht an solche von verschiedenem Typ, zu heften. Diese Eigenschaft geht bei Krebszellen verloren.

*Zellzyklus.* Die zeitbedingte Sequenz von Ereignissen, die in der Zelle in der Zeitspanne zwischen mitotischen Teilungen ablaufen.

*Zentrales Dogma.* Die grundlegende Beziehung zwischen DNA, RNA und Protein: DNA dient sowohl als Matrize für ihre eigene Replikation als auch für die RNA-Synthese; die RNA dient ihrerseits als Matrize bei der Proteinsynthese.

*Zwei-Faktor-Kreuzungen.* Genetische Rekombinationsversuche unter Verwendung zweier Marker (z.B.  $a^+ b^+ \times ab$ ).

*Zygote.* Ergebnis der Vereinigung zwischen weiblichen und männlichen Geschlechtszellen. Die Zygote enthält daher eine diploide Zahl von Chromosomen.

*Zyklisches AMP.* Adenosinmonophosphat, in dem die Phosphatgruppe zu einem Ring geschlossen ist (Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'- und 5' Kohlenstoffatom). Spielt eine Rolle bei der Regulation der Genexpression in Bakterien- und Eukaryotenzellen.



## SACHREGISTER

- A + T/G + C Verhältnis, 245, 286, 318  
 Abbauwege, 43, 44, 89  
 Acetyl-CoA, Bildung aus Pyruvat, 50  
   als wichtige Zwischenstufe im Stoffwechsel, 89  
   energiereiche Bindung in, 136  
   und Biosynthese der Fettsäuren, 90, 136  
 Actinomycin D, 579  
 Adaptor-RNA, (*siehe* Transfer-RNA)  
 Adenosindiphosphat (ADP), als energiereiche Verbindung, 137, 140  
   als hauptsächlicher Akzeptor für Phosphatgruppen, 46, 47, 55  
 Adenosinmonophosphat, zyklisches (*siehe* Zyklisches AMP)  
 Adenosintriphosphat (ATP), bei der Aktivierung von,  
   als Energiequelle bei Biosynthesereaktionen, 140-143  
   als Quelle energiereicher Phosphatgruppen, 46  
   als Vorstufe für zyklisches AMP, 429  
 Aminosäuren für die Proteinsynthese, 143, 343  
   bei Gruppenübertragungsreaktionen, 141, 142  
   Entstehung im Krebs-Zyklus, 52  
   Entstehung während der Photosynthese, 55  
 Adenovirus, elektronenmikroskopische Aufnahme, 439  
 Adenylcyclase, 429  
 Aktivierendes Enzym, (*siehe* Aminoacylsynthetase)  
 Aktivierter Zustand, 133, 134  
 Aktivierung, von Aminosäuren für die Proteinbiosynthese, 143, 343  
   und Gruppenübertragungsreaktionen, 140, 141  
   von Nukleotidmonophosphaten für die Biosynthese der Nukleinsäuren, 143, 144, 145  
 Aktivierungsenergie, 133, 134  
   Einfluß von Enzymen, 134, 135  
 Allele, 19  
 Allosterische Proteine, 433  
 Alpha-Helix ( $\alpha$ -Helix), atomare Abmessungen, 120  
   und Sekundärstruktur der Proteine, 60  
   Unterbrechung durch Prolin und Disulfidbrücken, 162, 163  
 Aminoacyl-adenylate, als energiereiche Verbindungen, 137  
   als Zwischenstufen bei Proteinbiosynthese, 143  
 Aminoacylsynthetase, 143, 341, 342, 343  
 Aminoacyl-tRNA, Aminosäureaktivierung, 341-343  
   schematische Darstellung, 335, 336  
 Aminosäureaustausch, in menschlichen Hämoglobin-Mutanten, 227, 389  
   in TWV-Protein, 389, 391  
   in Tryptophan-Synthetase-Mutanten bei *E. coli*, 230

- Aminosäuren, Aktivierung für die Proteinbiosynthese, 143, 340-342, 343
  - Bindung an spezifische tRNA-Moleküle, 333-335
  - Formeln, 82
  - genetische Kontrolle der Sequenz in, 226, 228
  - in vitro* Einbau in Proteine, 373, 374, 375, 379
  - Proteinen, 226-229
  - stereoisomere Konfigurationen, 115
- Angeborene Stoffwechselfehler, 27
- Anticodon, Molekülmodell und Wobble, 386-387
  - Wobble im, 384-387
- Antigen, 524, 525, 526
  - Abwesenheit in Antikörper-produzierenden Zellen, 541
  - Effekt wiederholter Injektionen von, 537, 539
  - schematische Darstellung, 526
  - Stimulation der Antikörperproduktion durch, 524-526, 530, 537
  - «T», 564, 566
  - Tumorspezifisches, 554-555, 570
  - und Überleben des Wirtes, 571
- Antikörper, 524
  - Aminosäuresequenz der, 532-533, 534
  - Denaturierung und Renaturierung, 530
  - Evolution, 532, 534-535
  - Spezifität, 529-531, 532
  - Struktur, 527-529, 530
- Antikörperbildung,
  - Instruktionstheorie, 530, 541
  - Klon-Selektionstheorie der, 541-543
  - Selektionstheorie, 530, 531, 537, 541
- Antikörper-Biosynthese, als Abwehrmechanismus, 524-526, 529, 555
  - als Modellsystem für die Zelldifferenzierung, 524, 545
  - codierende Gene, 542
  - Rekombination und Mutation, 543
  - die Plasmazelle als Ort der, 537-541
  - in vitro*, 544, 545
- Anti- $\sigma$ -Faktor, und biologische Uhren, 495
- Antiterminationsfaktor, «N»-Protein des Phagen  $\lambda$  als, 457
- Arabinose-Operon, «C»-Genprodukt des, 427
  - Endprodukt-Hemmung, 430
  - und positive Kontrolle, 427, 428
- Arginin, Biosynthese in *E. coli*, 220, 221, 414
- Atmung, chemische Gesamtreaktion, 36
- Atmungskette, Enzyme, 51, 53
- Aufbau aus Untereinheiten, bei Viren, 439, 440
- Vorteil, 126
- Bacillus Subtilis*, Chromosomen, 276
- Bakterien, haploider Charakter, 7
  - Kolonienbildung, 68, 71
  - Vorteil für genetische Untersuchungen, 180
- Bakteriophage  $\lambda$  Crossing-over während der Vermehrung, 210
  - als lysogener Phage, 189-192
  - DNA-Heteroduplex, 298
  - Genkarte, 454
  - Immunität, Repressor, 411, 412
  - Integration der DNA in das Wirtszell-chromosom, 192
  - Kartierung von Deletionen, 286-288, 289, 290
  - Kontrolle der Expression später Gene, 456-458
  - «N»-Protein, 455
  - Operons, 457
  - Promotor-Mutationen, 417
  - Rekombinationskarte, 290
  - Richtung der DNA-Replikation, 262
  - schematische Darstellung der Struktur, 188
  - Transkription der DNA, 325, 455, 459
  - zirkuläre DNA aus, 258, 259
- Bakteriophage  $\phi \times 174$ , einzelsträngige zirkuläre DNA, 253
- Synthese infektiöser DNA, 259-260
- Transkription, 459

- Bakteriophage Q $\beta$ , RNA-Synthetase, 465, 466
- Bakteriophage R17, Bindungsstellen für Ribosomen, 356, 462, 463
- Gene, 461, 462
- Genkarte, 467
- Kettenterminations-Sequenz, 389, 390
- Nukleotidsquenz, 467, 469
- polare Mutationen, 464
- Bakteriophage SP8, Transkription, 321
- Bakteriophage T2, Autoradiographie der Chromosomen, 256
- Plaquemorphologie von Mutanten, 205, 208
- seltene Komponenten in der DNA, 446, 447
- Struktur, 188
- Bakteriophage T4, Analyse der genetischen Feinstruktur, 214-216, 217
- als komplexes Virus, 445, 466, 448
- Bestandteile der Proteinhülle, genetische Kontrolle, 225
- Crossing-over während der Vermehrung, 210
- DNA-Transkription, 325, 453
- genetische Analyse, 178
- Genkarte, 209
- Infektion durch T4 und Veränderung der Ribosomen, 449, 450
- Lysozym, 375
- positive Kontrolle der Phagenentwicklung, 453, 454
- seltene Komponenten in der DNA, 446, 447
- $\sigma$ -Faktoren, 453, 454
- Struktur, 188
- Vermehrungszyklus, 445, 451
- Bakteriophage T6, seltene Komponenten in der DNA, 446, 447
- Struktur, 188
- Bakteriophagen, bedingt-letale Mutationen, 206
- auf *E. coli* als Wirt, 187, 188
- Mutationen, die die Plaquemorphologie verändern, 204, 205
- Plaquebildung, 189, 190
- Transduktion durch Phagen, 201
- Basenanaloge, als Mutagene, 283, 285
- Basenpaare, in der DNA-Doppelhelix, 302
- Befruchtung, 7, 476-477
- Bence-Jones Proteine, 532
- $\beta$ -Galactosidase, hydrolytische Wirkung auf Lactose, 407, 408
- als induzierbares Enzym, 409-416
- Konzentrationen, in *E. coli*, 407, 408, 409
- mRNA, 409, 410, 412-414, 421-422
- Struktur, 407
- $\beta$ -Konfiguration von Polypeptidketten, 162
- Biologische Uhren, 494
- und Anti- $\sigma$ -Faktoren, 495
- und  $\sigma$ -Faktoren, 494, 495
- Biosynthese kleiner Moleküle, z.B. Serin und Uridin-5'-phosphat, 149-152
- Biosynthesewege in *E. coli*, 90, 91
- 5-Brom-uracil, als Mutagen, 285
- Bruch und Wiedervereinigung, als Mechanismus der genetischen Rekombination, 291-295
- Burkitt-Lymphom, Herpesvirus aus, und Mononukleose, 579, 580
- Chiasmata, 498
- Chlorophyll, Biosynthese des Porphyrinringes, 153, 154, 155
- Rolle bei der Photosynthese, 55
- Struktur, 153
- Chloroplast, als Bestandteil von Pflanzenzellen, Evolution, 487
- Rolle bei der Photosynthese, 55
- Chromatide, 5
- Verhalten während der Meiose, 21, 175
- von Lampenbürsten-Chromosomen, 498
- Chromosomen, 4
- Crossing-over, 19, 173-175
- Fragment, als Träger genetischen Materials, 275
- Gene als Teile der, 17, 503-504

- Gene in Chromosomenbanden, 503-504
- Geschlechtschromosomen, 17, 18, 20, 21, 502,
  - in *E. coli*, 73-74, 195-201
  - in Eukaryoten, 496-504, 505
  - DNA, 499
  - Histone, 499
- in Oozyten von Wirbeltieren, 496-499
- Information in Chromosomen, 237
- Kartierung, 174-179, 286
- Kartierung der Speicheldrüsen-Chromosomen, 286
- Kontrolle der Funktion, 503
- Lampenbürsten-Chromosomen, 496, 497
  - Mikrophotographie, 498
- Lokalisierung der Genanordnung durch genetische Kreuzungen, 173, 177
- mutierte, Komplementierung, 219
- normale menschliche, 491
- polytäre, 499
- redundante Gene, 504
- Rekombination, 174, 175
- Replikation von Säugetier-Chromosomen, 499, 500
- Riesenchromosomen, 499
  - Autoradiographie, 502
- Ringform Bakterieller Chromosomen, 195, 199, 201
- Sichtbarmachung und Kartierung von Deletionen, 286-288, 289, 290
- Strangtrennung bei Bakteriophagen, 286, 287, 288
- Synapse, 21
  - und Geschlechtsbestimmung, 17
- Verhalten während der Meiose, 7-9, 175
  - während der Mitose, 6
- von HeLa-Zellen, 490, 491
- von Viren, 183-185
- Chromosomen-Puffs, 501-502
  - und aktive Gene, 501
  - Mikrophotographie, 505
- Chymotrypsinogen, Aminosäuresequenz, 157, 158
- Codons, 376, 377, 378-382, 383, 387-389
  - Ablesafehler, durch Streptomycin, 399, 401
  - durch Suppresorgene, 393, 397
  - Initiierungs-(Start-)-Codon, 387-388, 390
  - Kettenabbruch, 388-389, 390
  - 64 mögliche Codons, 376
  - regelmäßige Kopolymere und Zuordnung, 380-382
  - Veränderungen, und Aminosäureaustausch, 391
  - Zuordnung durch tRNA-Bindung, 379-380
  - Zuordnung von Aminosäuren zu, 382
- Coenzyme, 40
  - Beziehung zu Vitaminen, 56
- Core-Enzym, der RNA-Polymerase, 327
  - Veränderung nach T4-Infektion, 453
- Crossing-over, 19
  - falsche Paarungen beim Crossing-over und 'hot spots', 280
  - Fehler beim Crossing-over und Mutationen, 301-303
  - innerhalb eines Gens, 214-216, 217
  - molekularer Mechanismus, 291-295
  - Unabhängigkeit von der DNA-Replikation, 294
  - während der Virusvermehrung, 208-210
- Cysteinreste, bei der Bildung von Disulfidbrücken, 157-161
- Degeneration (Entartung) des genetischen Codes, 383-387
- Deletionsmutanten, Kartierung, 218, 286-288, 289, 290
  - in der rII-Region des Bakteriophagen T4, 218
- Denaturierendes Protein und DNA-Replikation, 265
- Denaturierung von Makromolekülen, 57, 125
- 3'-Desoxydenosin und Richtung des Kettenwachstums der RNA, 326
- Desoxy-brom-uridin, 258



**Desoxyribonukleinsäure** (*deoxyribonucleic acid*, DNA)

als Matrize für die RNA-Synthese, 314, 317, 318

Beweis für die genetische Rolle, 61, 202-204

Dichtegradienten-Zentrifugation, 286  
doppelhelikale Struktur, 61-62, 122, 123  
einzelsträngige DNA, haarnadelartige Schlingen, 296

Enzym für die Replikation, 265, 275  
enzymatische Synthese, 250-252

Gehalt in den Lampenbürstenschlingen, 507

in Chromosomen von Eukaryoten, 499  
in *E. coli*, 92

in Säugetierzellen, 475-476

Informationsgehalt, 279

Menge, und konstanter Gehalt in Chromosomen, 258-259

mitochondriale, 487

mutagene Wirkung von salpetriger Säure, 283

Nukleotide als Bausteine, 83

Operator als, 412

repetitive Sequenzen, 504, 506

Replikation, 61, 62, 245-255, 262-272, 442-443, 499, 500

Induktion von Enzymen für die DNA-Replikation von Polymavirus, 565, 566

ringförmige Moleküle, als Chromosomen, 258-259

ringförmige und lineare Form, Umwandlung ineinander, 258

Satelliten-DNA, 506

«Spacer»-DNA (als Zwischenraum), 511

strukturelle Stabilität, 122-124

Transformation durch DNA, 202, 203, 239, 240, 275

von Polymavirus, elektronenmikroskopische Aufnahme, 561

Wasserstoff-Brückenbindungen, 122-124

Watson-Crick-Modell, 61

Dichtegradienten-Zentrifugation, 286

*Dictyostelium discoideum*, (siehe Schleimpilz, Zelldifferenzierung)

Diphosphopyridin-nukleotid (DPN: siehe Nicotinamid-adenin-dinukleotid)

Diploider Zustand, und Geschlechtszyklus, 10

Disulfidbindungen, Anordnung in Chymotrypsinogen, 161

als strukturelle Eigenschaft von Proteinen, 161

Beteiligung bei der Antikörper-Struktur, 527, 535

Verhalten während der Denaturierung und Renaturierung von Proteinen, 164, 165

DNA-Biosynthese, Desoxynukleosidtriphosphate als Vorstufen, 144

DNA-DNA-Hybridisierung, 247, 288

DNA-Polymerase, 250, 252, 259, 260, 261, 269, 270, 271,

Struktur, 252

und genetische Rekombination, 296

und *in vitro* Synthese viraler DNA, 259  
Zellen ohne, 275

DNA-RNA-Hybride, 319, 321, 322

und Gen-Redundanz, 504

Dominante Merkmale, 12, 14, 15

Drei-Faktor-Kreuzungen, und Reihenfolge von Genen, 177

*Drosophila melanogaster*,

Augenfarbe, als von vielen Genen abhängige Eigenschaft, 24

Genkarte, 179

Geschlechtsbestimmung, 18

Mutantengene, 23, 24

Speicheldrüsen-Chromosomen, «Puffing» und RNA-Synthese, 499-503, 505

Vererbung geschlechtsgebundener Gene, 20, 21

Vorteile als Versuchsmodell, 19

Einheitlichkeit der Biochemie, 43

Eizellen, unbefruchtete, präformierte RNA, 518-520

- Embden-Meyerhof-Schema der Glykolyse, 42, 43, 44, 45
- Endonuklease, 261
  - bei der genetischen Rekombination, 296
  - bei der Reparatur der DNA, 273, 274
  - und DNA-Replikation, 261-262, 269, 270, 271
  - und *in vitro* Synthese viraler DNA, 259, 260
- Endoplasmatisches Retikulum, elektronenmikroskopische Aufnahmen, 312
- Endprodukt, Effekt auf die Enzymaktivität, 429-433
  - und Enzymsynthese, 409
- Energereiche Bindungen, und freie Energie der Hydrolyse, 136, 137
  - als Voraussetzung für biosynthetische Reaktionen, 138
  - wichtige Klassen, 137
- Enolphosphate, als energiereiche Verbindungen, 137
- Entgegengesetztes «Rolling Circle» Modell der RNA-Replikation, 268-271
- Enzymatische Aktivität, einmalige Aminosäuresequenz und, 232, 233, 234
- Enzyme, und Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion, 134, 135
  - Effekt auf die Lage des chemischen Gleichgewichts, 135
  - genetische Kontrolle der Synthese, 220, 221, 228
  - induzierbare, 409, 410
  - kristallisierte Proteine als, 31
  - reprimierbare, 409
  - Spezifität, 47, 48
- Enzym-Substrat-Komplex, Bildung, 49
  - und schwache Wechselwirkungen, 117, 118
- Episome, Definition, 194
  - F-Faktor und Chromosomen lysogener Phagen, 194
- Erbkrankheiten, Aminosäurestoffwechsel und, 27
  - Sichelzellanämie als, 220
- Erster Hauptsatz der Thermodynamik, 99
- Erythrozyten, Fusion mit HeLa-Zellen, 516
  - Unfähigkeit, sich zu teilen, 514
- Escherichia coli*, Biosynthese des Arginins, 220, 221
  - Chromosomen, 73-74
  - Ringform, 195, 201
  - Wachstumspunkt, 265
  - DNA, 68, 75, 80, 92
  - Eigenschaften der «durchschnittlichen» Zelle, 70, 74
  - Einbau des  $\lambda$ -Phagen-Chromosoms in das *E. coli* Chromosom, 192
  - elektronenmikroskopische Aufnahme, 68, 78
  - Erfordernis von Wachstumsfaktoren, 181
  - Extrakte, und *in vitro* Proteinsynthese, 372-275
  - Generationszeit, 69
  - Genkarte, 195-199, 200
  - Geschlechtszyklus, 192, 194
  - induzierbare Synthese der  $\beta$ -Galactosidase, 407, 409, 410, 412, 415, 417
  - Infektion durch Bakteriophagen, 187, 188, 189
  - Mutanten, die spezifische Wachstumsfaktoren benötigen, 182
  - Resistenz gegen Bakteriophagen, 181, 182
  - Sexualität, Beweise für, 183
  - synchronisiertes Wachstum, 72
  - Tryptophan-Biosynthese, 228
  - Tryptophan-Synthetase, 228
    - Mutanten, 226-235
  - ungefähre chemische Zusammensetzung, 80
  - Wachstumskurve, 71
  - wichtigste Stoffwechselwege, 90-91
- Evolution, Theorie, 1, 2

- vererbare Veränderungen als Grundlage der, 25
- Exonuklease, 261
  - bei der genetischen Rekombination, 296
  - bei der Reparatur der DNA, 274
- Exponentielles (logarithmisches) Wachstum,
  - von Bakterien, 71, 72
- $F_1$ -Generation, 11, 15, 16
- Feedback-Inhibition (Rückkopplungshemmung), allosterische Proteine
  - Proteinen, 429-433
  - und Regulation der Funktion von Proteinen, 429-433
- Fertilitätsfaktor (F-Faktor), Grund für die Sexualität in *E. coli*, 192-194
- Flavin-adenin-dinukleotid (FAD),
  - als Coenzym bei der Wasserstoffübertragung, 42
- Flavin-mononukleotid (FMN), als Coenzym, 41
- Freie Drehbarkeit um Einfachbindungen, 98
- Freie Energie, Definition, 100
  - Reaktionen im Gleichgewicht, 100
  - Stoffwechselwege und, 135
  - Veränderungen und Gleichgewichtskonstante, 100, 101
  - Veränderungen während chemischer Reaktionen, 133
- Freisetzungsfaktoren,
  - und Termination (Abbruch) von Polypeptidketten, 364
- Fusidinsäure, Inhibitor der Polypeptidsynthese, 362
- Galactose, 407, 408
- Galactose-Operon, Endprodukt-Hemmung, 429
- Gärung, 42, 43, 54
  - phosphorylierte Zwischenstufen bei der, 43
  - zellfreie Extrakte zur Untersuchung, 42
- Gekoppelte Reaktionen,
  - Änderung der freien Energie (Enthalpie), 139, 140
  - Oxydation-Reduktion, 51, 53
  - Oxydative Phosphorylierung, als gekoppelte Reaktion, 51, 53
- Gene, «durchschnittliche», Zahl von Nukleotidpaaren, 288-291
  - Chromosomenbanden, 503, 504
  - Feinstruktur-Analyse, 214-216, 217
  - gekoppelte, 19
  - historische Definition, 13
  - Kontrolle der Aminosäuresequenz in Proteinen, 226-235
  - Lokalisation auf den Chromosomen, 24
  - mit verwandten Aufgaben, räumliche Nachbarschaft, 224-225
  - mutierte, 19
    - in *D. melanogaster*, 23, 24
  - Regulatorgene, 410
  - Selbst-Replikation, 26
  - Suppressorgene, und Ablesefehler, 392-398, 399, 402
  - Vererbung geschlechtsgebundener Gene in *Drosophila*, 20, 21
  - von *E. coli*, Anordnung auf den Chromosomen, 24
  - Wildtyp-Gene, 19
- Gen-Enzym Beziehung, 27, 220, 221
- Genetische Feinstruktur, der rII-Region des T4-Phagen, 214-216, 217
- Genetische Kreuzungen, 11, 19, 173, 176-179
- Genetischer Code, Ablesefehler, und Suppressorgene, 392-398, 399, 402
  - Degeneration (Entartung), 383-387
  - lineare Ablesung, 304-306
  - richtige Zuordnung der Codons, 382
  - Triplett-Charakter, 304-306
  - Universalität, 403
- Genetische Rekombination, und Antikörper-Biosynthese, 543
  - bei Kreuzungen zwischen genetisch unterschiedlichen Phagenpartikeln, 206-207

- Beteiligung spezifischer Enzyme, 295, 296, 297  
 innerhalb von Gen, in der rII-Region des T4-Bakteriophagen, 214-216, 217  
 Mechanismus, 291-296, 297  
 nichtreziproke, 300-301  
 Protein, das die genetische Rekombination fördert, 296, 297, 298  
 und Crossing-over während der Meiose, 174, 175  
 und Sexualität bei Bakterien, 183, 184  
 und Transduktion, 201, 202  
 und Transformation, 202, 203  
 und Verdoppelung der Chromosomen, 292  
 Gekarte, 178  
   vom Phagen  $\lambda$ , 454  
   vom Phagen R17, 467  
   vom Phagen T4, 209  
   von *D. melanogaster*, 179  
   von *E. coli*, 200  
 Gen-Orientierung, Unabhängigkeit der Transkription von, 323  
 Genotyp, 13, 16  
 Gen-Redundanz,  
   Bestimmung der, 504-505  
   in Chromosomen, 504  
   von rRNA-Cistren, 508  
 Genumwandlung, 300, 301  
   nicht reziproke Rekombination und, 300-301  
 Geschlechtsgebundene Merkmale, 19, 20, 21  
 Gewebekultur, von tierischen Zellen, 489-492  
   Zelldifferenzierung, 491  
 Gleichgewichtskonstante, 100, 134  
   und Änderung der freien Energie (Enthalpie), 100, 101  
 Glucose, Abbau, 42-43  
   als Energiequelle, 132  
   Bedeutung im Intermediär-Stoffwechsel, 87-91  
   Inhibition (*siehe* Katabolit-vermittelte Repression)  
   Glykogen, Biosynthese, 154, 156, 157  
   als Speicherform der Glucose, 90-91  
   struktureller Aufbau, 81, 84  
 Glykolyse, 43  
   in Tumoren, 554  
 Gruppenaktivierung, 141  
 Gruppenübertragungsreaktionen, und Aktivierung, 140, 141  
 Guanidinphosphat, als energiereiche Verbindung, 137  
 Guanosin-triphosphat (GTP), Bildung, 141  
   bei der Bildung der Peptidbindung, 361-362  
 Häm, als prosthetische Gruppe, 159  
 Hämoglobin, Aminosäureaustausch, 227, 391  
   Aufbau aus Untereinheiten, 125, 128  
   Biosynthese, 512  
   die Struktur beeinflussende Mutationen, 220, 221, 226  
   zellfreie Synthese, 375  
 Haploider Zustand, 7, 9  
 Harnstoff, als Denaturierungsmittel, 125, 128, 164  
 Hefen, als Modellsysteme, 486-487  
 HeLa-Zellen, 490  
   Chromosomen, 490, 491  
   Klone, 492  
   mRNA, 511  
   Verschmelzung mit Erythrozyten (Fusion), 516  
 Helfevirus, bei der RSV-Infektion, 577-578  
 Herpesvirus, und Burkitt-Lymphom, 579  
   elektronenmikroskopische Aufnahme, 438  
   und Cervix-Karzinom, 580  
 Heterochromatin, repetitive DNA-Sequenzen im, 504, 506  
 Heteroduplices, 298-300  
 Heterozygote Genpaare, 13  
 Heterozygoten, und Gen-Enzym Beziehung, 223  
 Histidin-Biosynthese,



- Biosyntheseweg, 222  
kontrolliert durch benachbarte Gruppen von Genen, 225  
Regulation, 414  
Histone, Proteinbestandteile der Chromosomen, 172, 499  
Hohe Frequenz der Rekombination (Hfr), in Bakterien, 193, 194  
Homozygote Genpaare, 13, 24  
Hormone, und Induktion der Protein-synthese, 518  
«Hot spots», 217, 280, 302, 303  
Hüllprotein von Viren, 437-440  
Hybridisierung von Nukleinsäuren,  
DNA-DNA, 247, 288-291  
DNA-RNA, 319, 320-322, 324, 325, 504  
Hydrolytische Reaktionen, 87  
Hydrophobe Bindungen, 115, 116  
Immunologisches Gedächtnis, 541  
Immunologische Toleranz, 543-544  
*In vitro* Proteinsynthese, experimentelle Details, 372, 374, 375  
Induktoren und die Regulation der Proteinsynthese, 409, 410, 412, 413, 415  
Information, genetische, 8, 31, 92, 237, 279  
und Bestimmung der Aminosäuresequenz in Proteinen, 226  
Initiierungsfaktor der Polypeptidsynthese, 357, 358  
Insulin, aus Rind, Aminosäuresequenz, 157  
Intergene Nukleotidsequenzen, 286  
Intergene Suppression, 393  
Intermediärstoffwechsel, 36  
in *E. coli*, 87-89, 90-91  
Intragene Suppression, 393, 395  
Ionische Bindungen, 96  
Beziehung zu Wasserstoff-Brückenbindungen, 110, 111  
Stärke, 102  
Isoleucin, Biosynthese aus Threonin, 429, 430, 431  
Karzinogene, 556  
und Onkogene, 581  
Katabolit-vermittelte Hemmung, 429, 430  
und RNA-Transkription, 429  
und zyklisches AMP, 429  
Kern, 2-4  
Ort der RNA-Synthese, 311  
Kettenwachstum, von Polypeptiden, Start und Stoppsignale, 352-357, 358, 364  
Richtung, bei der Biosynthese der DNA, 263-326  
bei der Polypeptidsynthese, 352, 357  
Klon-Selektionstheorie, der Antikörpersynthese, 541-543  
Klone differenzierter Zellen, 492  
Kohlenwasserstoffe, aliphatische, 32  
aromatische, 32  
Kolinearität, eines Gens und seines Polypeptidprodukts, 226-229  
Komplementäre Strukturen, zwischen Antigen und Antikörper, 107, 108  
und schwache Wechselwirkungskräfte, 111  
Komplementationstest, 216, 218-220, 223  
als Beweis, daß benachbarte Gene zusammengehörige Funktion haben, 224  
Verwendung bei der genetischen Analyse von Polyoma, 565  
Konstitutive Enzymsynthese, 410-411, 416, 424-425  
Kontaktinhibition, 551-553, 562  
Verlust nach RSV-Transformation, 576  
Koordinierte Enzymsynthese, 414, 416  
Kopiewahl (*copy choice*), als Mechanismus bei der genetischen Rekombination, 291-295  
Kopplungsgruppen, 19, 24  
Korepressoren, und Regulation der Proteinsynthese, 408-409, 412-414  
Kovalente Bindungen, Änderung der freien Energie bei der Bildung, 101  
Definition und Eigenschaften, 96  
Energie und Bildung, 97, 99  
Krebs, 548

- als erbliche Veränderung einer Zelle, 556, 557
- als irreversible Differenzierung, 557
- als Verlust spezifischer zellulärer Affinitäten, 552-553
- Cervix, 580
- Induktion, durch Strahlung und Chemikalien, 556
- durch Viren, 558-582
- und Kontrolle der Zellteilung, 549-551
- und somatische Mutationen, 557, 558
- Krebszellen, selektive Agglutination, 555, 556
- Lactose, und Induktion der  $\beta$ -Galactosidase, 407, 409, 412, 413, 414
- Leseraster, des genetischen Codes, 304
- Rasterverschiebungen, 304, 305
- Lipide, struktureller Aufbau, 75, 76, 77
- Lösliche RNA, (*soluble* sRNA), siehe Transfer-RNA
- Lymphozyten, 537
- Lyse, während der Phagenvermehrung, 189
- Lysogene Bakterien, 189, 190, 455
- Lysogene Bakterienviren, 189-191
- Vermehrungszyklus, 191
- Lytische Viren, 189, 191
- Magnesium, und Bindung von mRNA an Ribosomen, 348
- und *in vitro* Ablesefehler, 392
- Makromoleküle, biologische, struktureller Aufbau, 79, 84
- Molekulargewichte, bestimmt in der Ultrazentrifuge, 58
- Struktur, bestimmt mit Hilfe der Röntgenkristallographie, 59-60
- Maltose-Operon, Katabolit-vermittelte Repression, 428
- Matrize, Notwendigkeit für die Proteinsynthese, 167
- Matrizenoberfläche, bei der Bildung polymerer Moleküle, 166
- Matrizen-RNA (siehe Messenger-RNA)
- Meiose, 7, 8, 9
- Austausch von Genen, 20
- Membranen, Anheftung von Mesosomen, 275
- als Zellbestandteile, 2, 3
- Phospholipide als Bestandteile, 76
- von *E. coli*, Darstellung im Elektronenmikroskop, 75, 78
- Mendelsche Gesetze, 10-14
- Mesosomen, 275, 276
- Messenger-RNA (mRNA), Abbau, 421-423
- Ableserichtung, 357, 358, 360
- als Matrize für die Proteinsynthese, 315, 347, 349, 357, 365-366
- Anheftung der Ribosomen, 347, 356-357
- differenzierte Ablesung eines einzigen Moleküls, 417, 419, 420, 421
- einzelsträngige virale RNA als mRNA, 373
- für  $\beta$ -Galactosidase, 421, 422
- für Hämoglobin, 504
- für Immunglobuline, 504
- in differenzierten Zellen, 511-512
- in transformierten Zellen, 569
- Molekülengrößen, 349
- polycistronische, 347
- präformierte, im unbefruchteten Ei, 518-520
- schematische Darstellung, 424
- stimuliert die Proteinsynthese *in vitro*, 372-373, 374, 375
- und Mangel spezifischer Proteine, 409-410
- und Mutationen im Operator, 416, 417, 418
- Messenger-RNA-Synthese, Mikroaufnahme, 505
- in den «Puffs» der Speicheldrüsen-Chromosomen, 499, 501-503, 504
- Methionin, N-Formyl-methionin, und Initiierung der Proteinsynthese, 352-357
- Mitochondrien, elektronenmikroskopische, 312
- Evolution, 487

- Ort der oxydativen Phosphorylierung, 53
- Rolle der DNA in, 487
- Mitose, 5, 6
- Monolayer, 551, 552
- Mononukleose, 579
- Multiples Myelom, 531, 532
- Mutagene, zur Erhöhung der spontanen Mutationshäufigkeit, 181, 182
- Wirkungsmechanismus, 283, 285, 286
- Mutationen, 25
- Additionen und Deletionen, und genetischer Code, 302-306
- bedingt letale, in Bakteriophagen, 206
- Deletion der rII-Region des Bakteriophagen T4, 218
- Einfluß auf die Plaquemorphologie von Bakteriophagen, 204-206
- Erfordernis von Wachstumsfaktoren als Folge, 181
- in *E. coli*, Resistenz gegen Bakteriophagen, 181
- Induktion durch Röntgenstrahlen, 26
- Insertions- und Deletionsmutationen, Effekt auf die Ablesung des Codes, 393-395
- Klassen, 282
- «leaky» (durchlässige), 304
- Lokalisierung im selben Gen, durch Komplementationsteste, 216, 218, 219, 220
- Missense, 389, 391-392, 398, 399, 400
- Nonsense, 389, 391-392
- nach Rasterverschiebung, 393
- Polypeptidfragmente werden synthetisiert, 392
- polare, im Phagen R17, 464
- Rasterverschiebung, Effekt auf das Polypeptidprodukt, 305
- «Rückmutationen», in Tryptophan-Synthetase bei *E. coli*, 234, 235
- somatische, und Krebs, 557, 558
- Suppressor, Effekt auf Repressor-Synthetase, 410-411 und Ablesefehler des genetischen Codes, 393-398, 399, 402
- Tryptophan-Synthetase, 226-235
- und Biosynthese der Antikörper, 543
- Mutationshäufigkeit, spontane, 280-282
- Mutierbare Stellen, 229-233, 280-281
- Myelomproteine, und Antikörper, 531
- Myoglobin, 3-D-Struktur, 160
- Myxoviren, 573
- RSV, 573
- Vermehrungszyklus, 575
- Negative Kontrolle, Definition, 426, 427
- Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD), als Coenzym bei der Wasserstoffübertragung, 41
- Nukleasen, virale und genetische Rekombination, 295-298
- Nukleolus, 3, 7
- und Biosynthese der rRNA, 508
- Onkogen-Theorie und Karzinogene, 581
- Operator, 412
- Bindung von Repressor, 412, 414
- konstitutive Enzyme und, 416, 418
- kontrolliert die  $\beta$ -Galactosidase-Synthetase, 415
- minimale Größe, 412
- und Kontrolle der Biosynthese von mRNA, 416, 417, 418
- Operon, Katabolit-sensitives, 429, 430
- Definition, 414
- Kontrolle der Funktion, 414-421
- Lactose, Katabolit-vermittelte Repression, 429
- Kontrolle der  $\beta$ -Galactosidase-Synthetase, 414-416
- Promotor der, 416, 417, 419, 420
- schematische Darstellung, 415
- und koordinierte Proteinsynthese
- Oxydations-Reduktions-Reaktionen, gekoppelte, bei der Atmungskette, 51, 53
- Rolle von Coenzymen, 40, 41
- Oxydative Phosphorylierung, 51
- Paarung, von Bakterien, 192
- «Rolling Circle», Modell der, 272

- Papierchromatographie, 58
- Peptidbindung, Bildung, Änderung der freien Energie, 139
- an Ribosomen, 342-345, 361, 365
- Peptidbindung, ebene Anordnung, 98
- als strukturelle Eigenschaft von Proteinen, 80, 84
- hydrolytische Spaltung, 86
- teilweiser Doppelbindungscharakter, 97, 98
- Phagen, (*siehe* Bakteriophagen)
- Phänotyp, 13, 15, 16
- Phosphatester, bei der Energiespeicherung, 43, 46
- Phosphodiesterbindungen, in der DNA, 250
- in der RNA, 314
- Photosynthese, Entstehung von ATP während der, 55
- chemische Gesamtreaktion, 37
- Phytol, als Bestandteil des Chlorophylls, 153
- Plaques, Bildung, Einfluß von Mutationen, 204-208
- Phagenvermehrung und, 189, 190
- und Segregation der Heteroduplex-DNA, 299
- von Polyoma-infizierten Zellen, 562, 563
- Plasmazellen, Antikörperproduktion in, 537-540
- elektronenmikroskopische Aufnahme, 540
- Entwicklungsstadien, 537, 538, 539
- Unfähigkeit, sich zu teilen, 514, 516
- Plare Moleküle, 104
- Polarität, von Nonsense-Mutationen, 463
- Polaritätsgradient, 464
- Polynukleotid-Ligase, Beteiligung bei der genetischen Rekombination, 297
- bei der Reparatur der DNA, 274
- und *in vitro* Synthese virale DNA, 259, 260
- Polynukleotid-Phosphorylase, bei der Synthese synthetischer Polyribonukleotide, 377
- Polyoma-induzierte Tumoren, Tumorspezifisches Antigen, 570
- Polyomavirus, Abwesenheit von transformierten Zellen, 561, 562, 567
- Chromosomen, als Duplexring, 258
- DNA, 559
- Integration in das Wirtszellchromosom, 567
- elektronenmikroskopische Aufnahme, 560
- frühe und späte mRNA, 564, 565
- genetische Struktur, 559
- Induktion von Wirtsenzymen, 565, 566, 572
- Mutanten, 565
- Temperatur-sensitive, 582
- physikalische Eigenschaften, 559, 560
- Replikation der DNA, 263
- elektronenmikroskopische Aufnahme, 265
- Veränderungen der Zelloberfläche, induziert durch Polyomavirus und DNA-Replikation, 573
- Vermehrungszyklus, 564
- Polypeptidketten, Anknüpfung von Aminosäuren, 143
- $\alpha$ -helikale Faltung, 120
- $\beta$ -Konfiguration, 162
- gleichzeitige Synthese und Faltung, 364
- Polypeptidsynthese, Initiierung, 351-358
- Polyphenylalanin, Synthese, durch Poli-U gesteuert, 378
- Polyribonukleotid, chemische Formel, 316
- Synthese durch Polynukleotid-Phosphorylase, 377-379
- synthetische, und der genetische Code, 376
- Polyribosomen, elektronenmikroskopische Aufnahme, 367
- Lebensdauer, 511
- Ort der Proteinsynthese, 365-366
- Polysaccharide, strukturelle Anordnung, 81, 84, 87
- Polyuridylsäure (Poly U), codiert Polyphenylalanin, 378



- Streptomycin und Ablesefehler, 399
- Porphyrin, Biosynthese, 154, 155
- Positive Kontrolle, 426-430
- der Entwicklung des T4-Phagen, 453-454
  - des Arabinose-Operons, 427-428
  - durch «N»-Protein des Phagen Lambda, 455, 456
- Primärstruktur von Proteinen, 159
- Promotor, Bindung von RNA-Polymerase an den, 416, 417, 419, 421
- Definition, 416
  - des Lactose-Operons, 416, 417, 419, 426
  - im Phagen  $\lambda$ , 417
  - von späten Proteinen, 456, 457
  - Kontrolle der Repressor-Synthese, 424, 425, 426
  - Mutationen, 417, 426
- Prophagen, Beziehung zum Wirtszellchromosom, 189-192
- Protein, Bence-Jones, 532
- chemische Gründe gegen eine Selbst-Duplikation, 166-169
  - durchschnittliche Größe, und durchschnittliche Gengröße, 306
  - frühe und späte, 450-451
  - Kontrolle des Auftretens, 451-452
  - konstitutive, 411
  - Struktur, primäre, 159
    - aus Untereinheiten aufgebaute, 125, 126
    - sekundäre, 162
    - tertiäre, 163
- Synthese, abhängig von Matrizen, 167
- Provirus, in Polyoma-transformierten Zellen, 578-579
- bei der RSV-Infektion, 578
- Purine, Basen als Bestandteile der Nukleinsäuren, 84-86
- Basenpaarung mit Pyrimidinen, 277
  - Biosynthese, erste Schritte, 150, 152
  - Formeln, 33
- Purinribonukleotid-triphosphate, und Initiierung der RNA-Ketten, 328
- Puromycin, als Inhibitor der Polypeptidsynthese, 362, 363
- Pyrimidine, Basen als Bestandteile der Nukleinsäuren, 84-86
- Basenpaarung mit Purinen, 277
  - Biosynthese, Uridin-5'-phosphat als Beispiel, 150-152
  - Formeln, 32
- Pyrophosphatase, Bedeutung für Biosynthesereaktionen, 144-146
- Pyrophosphatbindung, von Nukleosidtriphosphaten, als treibende Kraft für die RNA-Synthese, 320
- Pyrophosphate, als energiereiche Verbindung, 137, 144, 145
- Hydrolyse, als treibende Kraft für Biosynthesereaktionen, 144-146
- Regulatorgene, 410
- Rekombinations-förderndes Enzym, Stabilisierung einzelsträngiger DNA, 296
- Renaturierung, von DNA, 247, 288
- von Proteinen nach Denaturierung mit Harnstoff, 164, 165
- Reparatursynthese, der DNA, 272-275
- DNA-Polymerase, 275
  - Evolution, 274
  - Thymin-Dimere, 273, 274
- Repilizierendes Enzym, für DNA, 263, 276
- Repressoren, Bindung an Operatoren, 412
- als Proteinmoleküle, 411
  - Definition, 410
  - fehlende Rolle bei der Replikation des T4-Phagen, 452, 453
  - Isolierung aus Bakteriophagen, 411-412
  - Kontrolle der Synthese, 410, 424, 425, 426
  - und Regulation der Proteinsynthese, 410-420
- Retikulozyten, und Hämoglobinsynthese, 375
- stabile mRNA, 511-512
- Rezessive Merkmale, 12, 14
- und Gen-Enzym Beziehung, 223

- Ribonukleinsäure (*Ribonucleic acid*, RNA)  
 als Matrize für die DNA-Synthese, 578, 579  
 als Matrize für die Proteinsynthese, 315, 347, 349, 357, 358, 365-366  
 als mRNA bei der Proteinsynthese, 373  
 Basenverhältnis, fehlende Komplementarität, 321  
 Basenzusammensetzung enzymatisch synthetisierter, 319  
 Basenzusammensetzung in RNA verschiedenen Ursprungs, 317  
 chemische Formel eines Kettenabschnitts, 316  
 doppelsträngige, als virale replikative Form, 459, 460, 461  
 enzymatische Synthese, genaue Kopierung der DNA-Matrize, 318  
 Faltung, und doppelhelikale Bereiche, 325  
 große Moleküle in Eukaryoten, 509  
 elektronenmikroskopische Aufnahme, 510  
 Lebensdauer in Eukaryoten, 494, 495  
 Replikation, 459-462  
 Ribonukleotide als Bausteine, 315  
 Rolle bei der Proteinsynthese, 368  
 struktureller Aufbau, 81, 315  
 Synthese an DNA-Matrizen, 314, 317-323, 325, 326, 329  
 Transport von Kern in das Zytoplasma, 310  
 unterschiedliche Syntheserate entlang der Chromosomen, 480-481  
 virale, als genetisches Material, 438-440, 441-443, 459-462  
 zirkuläre, als virale replikative Form, 323
- Ribose, Struktur, 317
- Ribosomale RNA (rRNA), 346  
 Fehlen einer genetischen Rolle, 347  
 Funktion, 348  
 Größenklassen, 347  
 haarnadelartige Schlingen, 348  
 Nukleolus und Biosynthese, 508
- Redundanz der Gene für rRNA, 504  
 elektronenmikroskopische Aufnahme, 508  
 Synthese an DNA-Matrizen, 348, 349  
 von Säugetieren, Biosynthese, 507-509  
 45-S-Vorstufen, 507-509
- Ribosomen, Assoziation mit rRNA, 347, 356-358, 464  
 Bindungsstellen für tRNA, 359  
 Dissoziation und Neubildung bei der proteinsynthese, 350  
*E. coli*, Struktur, 345  
 Elektronenmikroskopische Aufnahme, 312  
 Kristallisation, in Hühnerembryozellen, 369  
 mitochondriale, 487  
 Modifizierung nach T4-Infektion, 449-450  
 Regulation des Proteingehalts, 407-408  
 Regulation der Zahl, 408, 409  
 Rekonstitution der 30-S-Untereinheit, 344, 345, 346  
 strukturelle Veränderungen, und falsche ablesung von Codons, 398, 399, 400  
 und Biosynthese von Proteinen, 311-315, 342, 344, 345, 346, 350-351, 356-362  
 Untereinheiten bei Eukaryoten, 507  
 von Prokaryoten- und Eukaryoten-Zellen, 485
- Rickettsien, 187, 470
- RNA-Biosynthese, Ribonukleosidtriphosphate als Vorstufen, 143-144
- RNA-Polymerase, 318  
 Bindung an Promotoren, 416, 417, 419, 421  
 Core-Enzym, 327  
 $\sigma$ -Faktor, und Spezifität des Transkriptionsbeginns, 327-328, 453, 485  
 Struktur, 327  
 Termination, 328-330
- RNA-Synthetase, des Phagen Q $\beta$ , 465, 466

- aus Vesicular Stomatitis Virus, 460-461
- und virale Replikation, 459-460
- 'Rolling Circle'-Modell der DNA-Replikation, 268, 272, 275
- Röntgenkristallographie, zur Bestimmung der Struktur des Myoglobins, 160
- von Proteinen, Hämoglobin und Myoglobin, 59, 60
- von tRNA, 340
- Röntgenstrahlen, und Brüche in der DNA, 272
- Rous assoziiertes Virus (RAV), als Helvivirus, 576
- als Tumovirus, 576-577
- Rous-Sarkomvirus (RSV), 574
- als Myxovirus, 574
- Infektion, elektronenmikroskopische Aufnahme, 574
- physikalische Eigenschaften, 575-576
- RNA-abhängige DNA-Polymerase, 579
- Zelltransformation, 575-578
- Salmonella typhimurium*, Histidin-Biosynthese, 222
- Schleimpilze, Zelldifferenzierung, 489
- Vermehrungszyklus, 488, 489
- Schwache chemische Wechselwirkungen, bei Antigen-Antikörper-Reaktionen, 527-529
- bei der Bestimmung der Molekülgestalt, 118, 119
- bei komplementären Moleküloberflächen, 111
- Strärke, 102
- und Affinität zwischen Enzym und Substrat, 117
- und Matrizenaktivität, 166
- und Rückkopplungshemmung (*Feedback*), 433
- und Spezifität der Aminoacyl-Synthetase, 334
- und Virusstruktur, 443
- und Wechselwirkung zwischen Repressor und Induktor, 412, 413, 416
- verschiedene Arten, 95, 96
- Segregationsverhältnis, 17
- Sekundärstruktur von Proteinen, 162
- «Seltene Basen», in Alanin-tRNA aus Hefe, 337, 338, 339
- in der DNA des T2-Phagen, 446, 447
- Struktur, 338
- Sendaivirus und Zellfusion, 516
- Sequenzpermutationen, 279
- Serin, Biosynthese in *E. coli*, 149, 150
- Sexueller Zellzyklus, 10
- Sichelzell-Anämie, 220
- $\sigma$ -Faktoren, und biologische Uhren, 494-495
- Dissoziation von Core-Enzym, 328
- in permissiven Zellen, 570
- «Q»-Protein des  $\lambda$ -Phagen als  $\sigma$ -Faktor, 457
- und Effekt von Viren auf den Stoffwechsel der Wirtszelle, 449
- und Entwicklung von Bakteriophagen, 453-454
- und Erkennung der Promotorregion, 428
- und Spezifität des Transkriptionsbeginns, 327-328
- und Sporulation von Bakterien, 485
- und Termination der messenger-Synthese, 415
- Virus-spezifischer, 327
- Skelett, biologisch wichtiger Polymerer, 84
- Spaltungsteilung, 476
- Sparsomycin, Inhibitor der Polypeptidsynthese, 362
- Spindel, 7
- Spontane Aggregation, 127, 128
- Sporulation, bakterielle, als Modell für die Zelldifferenzierung, 482-486
- und  $\sigma$ -Faktoren, 485
- Stoffwechselwege, abbauende, 88
- Änderung der freien Energie, 135
- Verzweigungspunkte, 88
- wichtigste, in *E. coli*, 90-91

- Streptomycin, Inhibitor der Polypeptidsynthese, 362  
 resistente *E. coli* Mutanten, 181, 401  
 und falsche Ablesung der genetischen Botschaft, 399, 401, 402
- Suppressorgene, 393-398, 399, 402
- SV40, (siehe Polyoma)
- Synapse, 21, 22
- Tabakmosaikvirus (TWV), Aminosäureaustausch in Mutanten, 389, 391  
 Aufbau aus Untereinheiten, 125, 438  
 Bildung des Virus aus RNA und Protein, 438, 440, 444  
 elektronenmikroskopische Aufnahmen, 439  
 RNA als genetisches Material, 441, 442
- Terminations- (Freisetzungs-) Faktor, bei der RNA-Transkription, 455  
 (siehe auch  $\sigma$ -Faktor)
- Tertiärstruktur von Proteinen, 163
- Thioester, als energiereiche Verbindungen, 137
- Thymin-Dimere, Ausschneiden und Reparatur, 273, 274  
 Bildung durch UV-Bestrahlung, 273
- Transduktion, 200, 201, 202
- Transferfaktoren, bei der Bildung der Peptidbindung, 361  
 bei der Translokation der Peptidyl-tRNA, 362
- Transfer-RNA, als Adaptor, 335  
 Alanin-spezifische, aus Hefe, Struktur, 337, 338, 339  
 Basenpaarungsbereiche, 339  
 bei der Bildung der Peptidbindung, 342, 344, 347, 353, 354, 359-362  
 Bindung an Komplexe aus Trinukleotiden und Ribosomen, 379, 380  
 Bindungsstellen auf den Ribosomen, 356, 359, 261  
 und Transferfaktoren, 361, 362  
 ganz bestimmte, einmalige Bestandteil bei Suppressormutationen, 396  
 398
- in Virus-infizierten Zellen, 449-450  
 kristallisierte, 340
- N-Formyl-methionin-spezifische, 353-355, 387  
 im Initiationskomplex, 355, 356  
 Vergleich mit Methionin-spezifischer, 354
- Röntgenbeugungsmuster, 341  
 «seltene» Basen, 337, 338, 339  
 seltene Spezies, 387  
 Struktur, 336, 339, 340, 341  
 Synthese an DNA-Matrizen, 349  
 und Aminosäureaktivierung, 143, 340-342, 343  
 und Degeneration (Entartung) des genetischen Codes, 384, 386  
 «Wobble» im Anticodon, 387
- Transformation, von Bakterien durch DNA, 202-204, 275  
 höherer Zellen durch Viren, 558-582
- Transkription, von RNA an DNA-Matrizen, 309-330  
 Unabhängigkeit von der Gen-Orientierung, 322, 325
- Translation, der Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz, 310
- Translationskontrolle, 511  
 in Eiern von Echinodermen, 518  
 in eukaryotischen Zellen, 518
- Tryptophan, Biosynthese in *E. coli*, 228
- Tryptophan-Synthetase, in *E. coli*, 228  
 Kolinearität, 228-229  
 mutierte Formen, 228-234
- Tumoren, 550  
 Glykolyse, 554  
 und Immunsuppressiva, 555
- Tyrosin-Aminotransferase in Rattenhepatomen, 519  
 Induktion durch Hormone, 518, 519
- Ultraviolette (UV) Strahlung und Brüche in der DNA, 273, 275
- Unabhängige Kombinierbarkeit, 15
- Unabhängige Segregation, 11-14
- Unpolare Moleküle, 104
- Uracil, Struktur, 317



- Uridin-5'-phosphat, Biosynthese in *E. coli*, 150-152
- Van der Waals-Bindungen, 96, 104-107, 113, 115, 116, 166, 414, 433  
Hydrophobe Wechselwirkungen zwir-  
kungen zwischen unpolaren Grup-  
pen, 115, 116  
Stärke, 102
- Van der Waals-Radien der Atome in  
biologischen Molekülen, 106
- Vererbung, chromosomale Theorie, 10,  
15
- Vesicular Stomatitis Virus (VSV), RNA-  
Synthetase, 460-461
- Viren (*siehe auch* Bakteriophagen),  
als Parasiten, 187  
als Ursache für Krebs, 561-582  
Aufbau aus Untereinheiten, 439-440  
Effekt auf den Stoffwechsel der Wirt-  
szelle, 444, 447, 448-450  
einzelsträngige virale RNA als mRNA,  
373  
elektronenmikroskopische Aufnahmen,  
438, 439, 440  
Größe und Gestalt, 186  
Infektion und Vermehrung, 186  
Infektiosität der Nukleinsäuren, 242,  
441  
Kontrolle der Vererbung bei Viren,  
183-185  
menschliche Tumoviren, 580  
obere Grenze der Größe, 470  
untere Grenze, 469  
struktureller Aufbau, 437-440  
«Vitalismus», 30  
Vitamine, Benziehung zu Coenzymen, 56
- Wachstumsfaktoren, 181  
Wachstumskurve, 71, 72  
Wachstumspunkt, Autoradiographie bei  
*E. coli* Chromosomen, 264  
bei der DNA-Replikation, 265  
Warburg-Effekt, 554
- Wasser, Gitterstruktur, 112  
Wasserstoff-Brückenbindungen, 96, 107-  
110  
bei der Bestimmung der Spezifität der  
Basenpaarung in der DNA, 270  
Stärke, 102  
und doppelhelikale Struktur der DNA,  
122-124  
und Löslichkeit in wäßrigen Medien,  
113  
ungefähre Längen, 108  
unter Beteiligung von RNA-Basen,  
314  
zwischen Wassermolekülen, 111-112  
«Wobble» im Anticodon, und Degene-  
ration (Entartung) des genetischen  
Codes, 384-387  
und Kontrolle der Syntheserate von  
Proteinen, 386
- Zelldifferenzierung, und Embryologie,  
477, 478-480  
in Gewebekultur, 492  
in Schleimpilzen, 488  
Irreversibilität, 479, 480  
und Krebs, 557  
und Verlust der Fähigkeit, sich zu  
teilen, 514, 516  
Modellsysteme zur Untersuchung von,  
481-482, 486  
Reversibilität auf der Ebene des Kerns,  
514  
und stabile mRNA-Spezies, 511
- Zellen, eukaryotische, 485-486  
als Grundeinheiten des Lebens, 2  
permissive gegen nichtpermissive, 562  
prokaryotische, 485-486  
untere Grenze der Größe, 469-471  
Zellfusion (-Verschmelzung), 516  
Aktivierung des Kerns, 516-517  
Sendaivirus, 516  
und Induktion von SV40-Virus, 568,  
569  
von Krebszellen, 557
- Zelllinien, Chromosomenzahlen, 489-492  
etablierte, 489

- Zellmembran und DNA-Replikation, 276
- Zellorganellen, zytoplasmatische Vererbung und, 487
- Zelltheorie, 2
  - allgemeine Anwendbarkeit, 8
- Zellzyklus, 491-494
  - Synchronisation, 492-493
- Zentrales Dogma, 309, 310
- Zentromeres, 5, 496
- Zwei-Faktor-Kreuzungen, und versuchsweise Zuordnung der Genanordnung, 176, 177
- Zweiter Hauptsatz der Thermodynamik, 100
- Zyklisches AMP, Adenylcyclase und, 429
  - als Mediatorsubstanz bei der Endprodukt-Hemmung, 429
  - und Transkription Katabolit-sensitiver Operons, 429, 430
- Zytoplasmatische Vererbung, und Zellorganellen, 487







**Inter European Editions**  
AMSTERDAM